

**Synthese und bioanalytische Evaluierung neuer Ruthenium(II)
N-heterozyklischer Carben-Komplexe als potenzielle
Chemotherapeutika**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Hilke Burmeister
aus Braunschweig

1. Referentin oder Referent:
2. Referentin oder Referent:
eingereicht am:
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Prof. Dr. Ingo Ott
Prof. Dr. Hermann Wätzig
26.08.2019
03.12.2019

Druckjahr

2020

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Lam, N. Y. S., Truong D., **Burmeister, H.**, Babak M. V., Holtkamp, H. U., Movassaghi S., Ayine-Tora, D. M., Zafar, A., Kubanik, M., Oehninger L., Söhnel, T., Reynisson, J., Jamieson, S. M. F., Gaiddon, C., Ott, I., Hartinger, C. G., From catalysis to cancer: Toward structure - activity relationships for benzimidazol-2-ylidene-derived N-heterocyclic-carbene complexes as anticancer agents. *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 14427–14434, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b02634.

Tagungsbeiträge

Burmeister, H., Ott, I., Ruthenium(II) N-heterocyclic carbene complexes: Biological evaluation as potential antitumor agents (Poster) 9th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (ISBOMC), York **2019**.

Burmeister, H., Synthese und bioanalytische Evaluierung von neuen Ruthenium(II)-NHC-Komplexen: Untersuchung von Metall- und Ligand-basierenden Effekten (Vortrag), Pharmazieseminar, Braunschweig **2019**.

Burmeister, H., Prochnow, P., Bandow, J., Ott, I., Ruthenium(II) N-heterocyclic carbene complexes: biological evaluation as potential antitumor and antibacterial agents (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Hamburg **2018**.

Burmeister, H., Prochnow, P., Bandow, J., Ott, I., New ruthenium(II)-NHC complexes as potential antitumor and antibacterial agents (Poster), 14th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Birmingham **2018**.

Burmeister, H., New ruthenium(II)-NHC complexes as potential antitumor agents (Vortrag), Seminarvortrag im Rahmen eines DAAD-Auslandsaufenthaltes an der Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Ljubljana **2017**.

Burmeister, H., Ott, I., New ruthenium(II)-NHC complexes as potential antitumor agents (Poster & Kurzvortrag), 8th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (ISBOMC), Moskau **2016**.

We must all face the choice between what is right and what is easy.

(Albus Dumbledore)

Für Mama.

Die anderen Burmeisters haben bereits ihre eigene Doktorarbeit. Diese hier ist für dich.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Chemotherapeutika	1
1.2 Metalle in der Medizin	3
1.2.1 Ruthenium-Komplexe auf dem Weg in die klinischen Studien	7
1.3 Chemische Grundlagen der <i>N</i> -heterozyklischen Carben- Rutheniumkomplexe	10
1.3.1 Chemische Grundlagen <i>N</i> -heterozyklischer Carbene	10
1.3.2 Ruthenium-Aren-Komplexe	13
1.4 Mögliche biologische Targets von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen	15
1.4.1 Entstehungsmechanismen von Krebs	15
1.4.2 Das Glutathion- und Thioredoxin-Redoxsystem	21
1.4.3 Die Rolle des Transferrins im Eisenstoffwechsel und als Target in der Krebstherapie	26
2. Strukturentwicklung und Zielsetzung der Arbeit.....	30
2.1 Komplette Substanzübersicht und Strukturmodifikationen	34
3. Chemische Darstellung und Analytik neuer Ruthenium(II)-NHC- Komplexe	35
3.1 Strukturdesign	35
3.1.1 Substitution der 5-Position des Benzimidazols.....	35
3.1.2 Verkleinerung des Imidazolgrundkörpers	36
3.1.3 Austausch der Chlorido-Liganden gegen andere Halogenide	36
3.1.4 Austausch der Chlorido-Liganden gegen Pyridin	37
3.2 Synthese	38

3.2.1	Synthese des 5-Fluorbenzimidazols	38
3.2.2	Synthese neuer Dibenzyl(benz-)imidazoliumhalogenide	39
3.2.3	Synthese neuer Ruthenium(II)-NHC-Komplexe	40
3.2.4	Synthese neuer Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden.....	41
3.3	Strukturaufklärung mittels Kristallstrukturanalyse	44
3.4	Besonderheiten bei der Interpretation von NMR-Spektren	45
3.4.1	Strukturaufklärung der Benzimidazoliumhalogenide mittels NMR- Spektroskopie.....	45
3.4.2	Strukturaufklärung der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mittels NMR- Spektroskopie.....	52
4.	Evaluation potenzieller zytotoxischer Wirkmechanismen	58
4.1	Bestimmung der Zellviabilität mittels Kristallviolettassay	59
4.1.1	Zellviabilität der Vorstufen	61
4.1.2	Zellviabilität der Substanzen mit Substitution in der 5-Position des Benzimidazols.....	62
4.1.3	Zellviabilität der Imidazolderivate	64
4.1.4	Zellviabilität der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden.....	65
4.1.5	Zellviabilität der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit Pyrithion-Ligand.....	66
4.2	Transferrin-vermittelte Proliferationshemmung	67
4.3	Live-Cell Imaging	69
4.4	Untersuchung des Apoptoseverhaltens	72
4.4.1	Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen	73
4.4.2	Apoptoseinduktion in resistenten Nalm-6 Zellen	75
4.4.3	Selektivitätsbestimmungen	78

4.4.4	Apoptoseinduktion in resistenten BJAB mock Zellen	79
4.4.5	Beurteilung des apoptotischen Wirkmechanismus	80
4.4.6	Bestimmung der proliferierenden Eigenschaften in Nalm-6 Zellen	83
4.5	Inhibition der Thioredoxinreduktase	84
4.5.1	Inhibition der TrxR mit Substanzen mit Substitution in der 5-Position des Benzimidazols.....	85
4.5.2	Inhibition der TrxR mit Imidazolderivaten.....	86
4.5.3	Inhibition der TrxR mit Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden.....	87
4.5.4	Inhibition der TrxR mit Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Pyrrithion-Ligand...	88
4.5.5	Referenzen	89
4.6	Zusammenfassung	90
5.	Bestimmung der Biodistribution	94
5.1	Die Vermessung des Rutheniumgehalts mittels HR-CS-AAS	96
5.2	Einführung in die Zellaufnahmestudien in MCF-7 Brustkrebszelllinien.	98
5.3	Zellaufnahmestudien von substituierten Benzimidazol-Ruthenium(II)-Komplexen	99
5.3.1	Zellaufnahmestudien unter Zusatz von FCS	99
5.3.2	Zellaufnahmestudien ohne Zusatz von FCS	100
5.4	Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Imidazolgrundkörper.....	101
5.5	Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden	102
5.6	Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Pyrrithion-Ligand	102

5.7	Transferrin-vermittelte Zellaufnahmestudien	104
5.8	Bestimmung der intrazellulären Fluorkonzentration	106
5.8.1	Vermessen des Fluor-Gehaltes der Zellaufnahme von 3d	107
5.8.2	Vermessen des Fluor-Gehaltes der Zellaufnahme von 2d	108
5.9	Proteinbindungsstudien	109
5.10	Zusammenfassung	111
6.	Antibakterielle Eigenschaften	113
6.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC)	113
6.2	Inhibition der bakteriellen Thioedoxinreduktase	116
6.3	Zusammenfassung	117
7.	Zusammenfassende Diskussion.....	121
8.	Material und Methoden	130
8.1	Verwendete Geräte	130
8.2	Verwendete Reagenzien	131
8.3.	Synthesevorschriften	136
8.3.1	Allgemeines Syntheschema.....	136
8.3.2	Synthese des 5-Fluorbenzimidazols	137
8.3.3	Synthese des Dimesitylethan-1,2-diimins	138
8.3.4	Synthese der (Benz-)Imidazoliumbromide	138
8.3.5	Synthese des Dimesitylimidazoliumchlorids	138
8.3.6	Synthese der Benzimidazoliumiodide	139
8.3.7	Synthese der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe	139
8.3.8	Synthese des Dibromo(<i>p</i> -cymol)ruthenium(II)-Dimers.....	140
8.3.9	Synthese des Ruthenium(II)-Pyridin-Komplexes	140

8.3.10	Synthese der Ruthenium(II)-NHC-Pyrithion-Komplexe.....	140
8.4.	Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen	141
8.4.1	(Benz)-Imidazole und weitere Vorstufen der NHC- Liganden	141
8.4.2	(Benz-)Imidazoliumhalogenide	142
8.4.3	Rutheniumfragmente	148
8.4.4	Ruthenium(II)-NHC-Komplexe	149
8.4.5	Ruthenium(II)-NHC-Pyrithion-Komplexe	159
8.5.	Kristallographische Tabelle	161
8.6.	Molekulare Modellierung	161
8.7	Allgemeine Zellkultur	162
8.7.1	Verwendete Zelllinien	162
8.7.2	Passage	164
8.7.3	Aussaat	165
8.8	Zellviabilitätstest	166
8.8.1	Durchführung.....	166
8.8.2	Abstoppen des Zellwachstums	167
8.8.3	Färben der Zellplatten	168
8.8.4	Berechnung.....	168
8.8.5	Transferrin vermittelter Antiproliferationstest an MCF-7 Zellen	169
8.9	Life-Cell-Imaging	169
8.10	Apoptoseuntersuchungen.....	169
8.10.1	Apoptoseinduktion in verschiedenen Zelllinien	170
8.10.2	Messung der mitochondrialen Permeabilität mittels JC-1 Färbung	170
8.10.3	Bestimmung der LDH-Freisetzung	171
8.10.4	Zellproliferation.....	171

8.11	Inhibition der Säugetier-Thioredoxinreduktase.....	171
8.12	Zellaufnahmestudien (Uptake).....	174
8.12.1	Transferrin-vermittelte Zellaufnahmestudien.....	175
8.12.2	Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford.....	176
8.12.3	Bestimmung des Metallgehalts der Uptakeproben mittels Atomabsorptionsspektrometrie	177
8.12.4	Bestimmung des Fluorgehaltes in den Uptakeproben mittels Molekülabsorptionsspektrometrie	179
8.13	Proteinbindungsstudien.....	180
8.13.1	Durchführung der Proteinbindungsstudien	180
8.13.2	Bestimmung des Metallgehalts der Proteinbindungsproben mittels Atomabsorptionsspektrometrie	181
8.14	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC)	182
8.15	Inhibition der bakteriellen Thioredoxinreduktase	182
9.	Literaturverzeichnis	184

Abkürzungsverzeichnis

Äq	Äquivalente
Ara C	Cytarabin
AS	Aminosäure
ATF	Apotransferrin
ATP	Adenosintriphosphat
Belm	Benzimidazol
Bn	Benzyl
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
COSY	zweidimensionale homonuklear (H,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie
Da	Dalton
DAD	Dimesitylethan-1,2-diimin
Dauno	Daunorubicin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (Ellmans-Reagenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)
ESI	Elektrosprayionisation
EXSY	Exchange Spectroscopy
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetales Kälberserum

FM	Fließmittel
GK	Grundkörper
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR-CS-AAS	High resolution continuum source atomic absorption spectroscopy (Hochauflösende Kontinuumsstrahler-Atomabsorptionsspektroskopie)
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
HSQC	zweidimensionale heteronukleare (H,C)-korrelierte NMR-Spektroskopie
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
Im	Imidazol
MAS	Molekülabsorptionsspektroskopie
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Mes	Mesitylen
m.I.	mit Inkubation
MPNO	2-Mercaptopyridin- <i>N</i> -oxid
MS	Massenspektrometrie
MTT	4,5-Dimethylthiazol-2-yl-[2,5-diphenyl]tetrazoliumbromid
n.a.	nicht aktiv
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n.b.	nicht bestimmt
NCI	National Cancer Institute (Krebsforschungszentrum der USA)
NHC	<i>N</i> -heterozyklisches Carben
NMR	Kernspinresonanz
NOE-Effekt	nuclear Overhauser effect (Kern-Overhauser-Effekt)
o.I.	ohne Inkubation
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<i>p</i> -Cym	<i>p</i> -Cymol

$[(p\text{-Cym})\text{RuBr}_2]_2$	Dibromo(<i>p</i> -cymol)ruthenium(II)-Dimer
$[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$	Dichloro(<i>p</i> -cymol)ruthenium(II)-Dimer
$[(p\text{-Cym})\text{RuI}_2]_2$	Diiodo(<i>p</i> -cymol)ruthenium(II)-Dimer
PF_6^-	Hexafluorophosphat
Pgp	P-Glykoprotein
ppm	parts per million
PSE	Periodensystem der Elemente
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RW	Reinstwasser
TF	Transferrin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Chemotherapeutika

Chemotherapeutika können in zwei Gruppen von Arzneistoffen eingeteilt werden: zum einen in die Stoffe zur Bekämpfung von Mikroorganismen (Antiinfektiva), von denen die Antibiotika zur Behandlung von bakteriellen Infektionen an erster Stelle zu nennen sind, zum anderen in die überaus bedeutende Gruppe der Zytostatika, welche zur Therapie von malignen Tumoren eingesetzt werden.

Die Bezeichnung Krebs geht auf den griechischen Arzt Hippokrates (ca. 400 v. Chr.) zurück, welcher bereits nicht heilende, geschwollene Gewebe oder Geschwüre als „Karkinos“ bezeichnete. [1] Auch wenn diese Namensgebung und erste medizinische Anamnese schon mehrere hundert Jahre zurückliegt, hat das Bestreben, den Ursachen für die Entstehung von Krebs auf die Spur zu kommen, aber auch das Bemühen, neue Therapien gegen diese Krankheit zu finden, nicht nachgelassen. Während gegen Ende des 19. Jahrhunderts Krebs vor allem mit chirurgischen Maßnahmen behandelt wurde, für die beispielhaft die Mastektomien von Halsted bei Brustkrebs stehen, hat sich die Krebsmedizin im Laufe des letzten Jahrhunderts über die Radiotherapie bis hin zur gezielten Antikörpertherapie stark weiterentwickelt. [2] Ein Pionier innerhalb dieser Entwicklung ist Paul Ehrlich, welcher den Begriff der „Chemotherapie“ neu geprägt hat. [3] Mit der Entwicklung von Arsenverbindungen zur Behandlung von Syphilis anhand von Kaninchenversuchen Anfang des 20. Jahrhunderts, trieb er die Arzneistoffentwicklung sowohl im Bereich der Antiinfektiva als auch in der Krebsforschung maßgeblich voran. [3]

Auch heute besteht ein hohes wissenschaftliches Interesse darin, Kenntnis und Wissen über Chemotherapeutika weiter auszubauen. Durch die Entwicklung der Antibiotika konnten zahlreiche Infektionskrankheiten eingedämmt und das Risiko bei Ereignissen wie Operationen oder Geburten deutlich gesenkt werden. [4] Die niedrigere Morbidität und Mortalität bakterieller Infektionen haben die Lebenserwartung deutlich erhöht. [5] Dadurch geraten andere Erkrankungen, wie zahlreiche Krebsarten, zunehmend stärker in den Fokus.

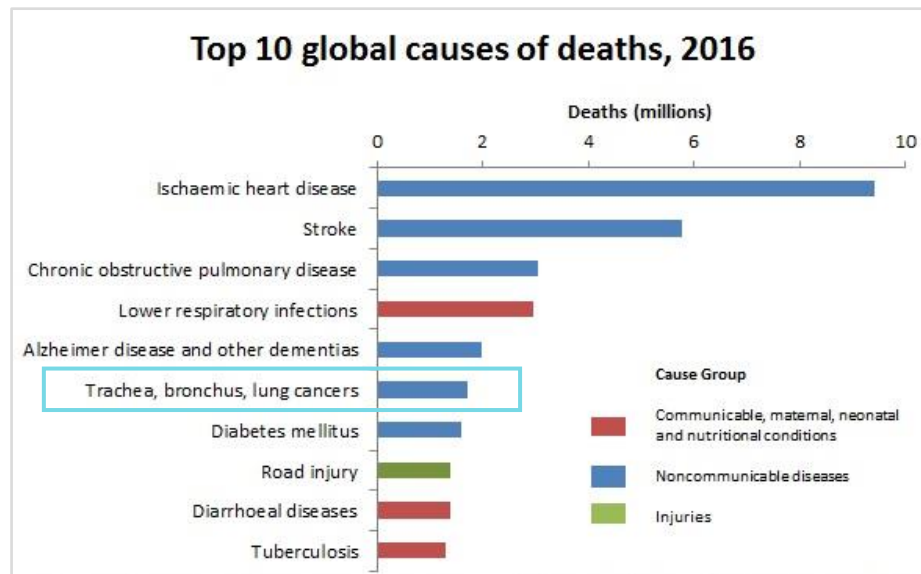


Abb. 1: Die weltweit 10 häufigsten Todesursachen im Jahr 2016 nach der WHO. [6]

So stellen laut WHO alleine Trachea-, Bronchial- und Lungenkarzinome im Jahr 2016 die sechsthäufigste Todesursache und eine der wichtigsten Krankheiten nach Herz-Kreislauf-erkrankungen weltweit dar (siehe Abb. 1, hellblaue Markierung). [6] Allein im Jahr 2014 erkrankten rund 476.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs. [7,8] Für das Jahr 2018 liegt die Zahl der weltweiten Todesopfer durch Krebs bei 9,8 Millionen, wodurch jeder sechste Mensch aufgrund einer Krebserkrankung stirbt. [9]

Antibiotika haben die Lebenserwartung der Menschen zwar erhöht, jedoch stellen der falsche Gebrauch in der Medizin und Landwirtschaft und die hierdurch verursachten Resistenzen ein großes Problem dar. [10] Es wird davon ausgegangen, dass in den nächsten 30 Jahren 2,4 Millionen Menschen weltweit an Antibiotika-resistenten Keimen sterben werden, wenn in den Verbrauchsprozess nicht eingegriffen wird. [11] Innerhalb der EU traten im Jahr 2015 nahezu 700.000 Infektionen mit Antibiotika-resistenten Keimen auf. [12] Die WHO hat im Juni 2019 eine erneute Warnung davor ausgesprochen, dass die entwickelten Resistenzen 100 Jahre Forschung rückgängig machen könnten. [13] Vor diesem Hintergrund wurde das AWaRE Programm gestartet (Access, Watch und Reserve). [14] Danach sollen die auf dem Arzneimittelmarkt erhältlichen Antibiotika in drei neue Klassen eingeteilt werden. Ca. 60 % werden in die zugänglichen Antibiotika eingeteilt, welche als Schmalspektrum-Antibiotika die 25 gängigsten Infektionen therapieren können (Gruppe Access). [13,14] Der Rest soll nur bei spezifischen Indikationen (Gruppe Watch), bzw. als Notfallantibiotikum (Gruppe Reserve) eingesetzt werden. Durch gezielte Überwachung in Krankenhäusern und in der Agrarwirtschaft soll somit der falsche Einsatz von Antibiotika vermieden und eine weitere Resistenzentwicklung gestoppt werden. [13,14]

Im Jahr 2018 haben die forschenden Pharmaunternehmen (VFA = Verband forschender Pharmaunternehmen) 36 Medikamente auf den Markt gebracht, 12 davon zum Einsatz bei Krebs, 4 im Bereich der Infektionskrankheiten, wodurch fast die Hälfte der Neuzulassungen in den Bereich der Chemotherapeutika fällt. [15]

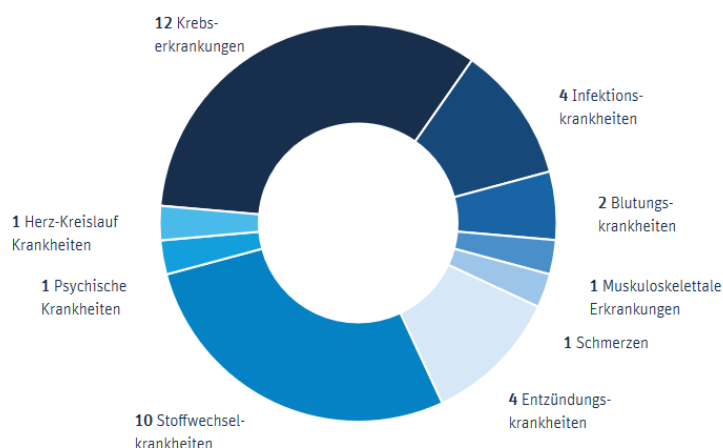


Abb. 2: Zugelassene Arzneimittel im Jahr 2018 der forschenden Pharmaunternehmen. [15]

Unter den vier Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten ist allerdings kein Antibiotikum im klassischen Sinne vertreten. Dennoch ist die Forschung gefordert, weitere Antibiotikaklassen zu entwickeln, welche die Resistenzen überwinden können.

Eine Wirkstoffklasse mit Indikationsgebiet als potenzielles Antibiotikum, aber vor allem auch Zytostatikum, stellen metallorganische Komplexe, z.B. mit Ruthenium als Zentralatom, dar.

1.2 Metalle in der Medizin

Zahlreiche Metalle, wie Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Mangan, Eisen, Kobalt, Kupfer, Zink und Molybdän, sind essenziell für den Organismus. [16] Die Elemente dienen zur Regulation des osmotischen Drucks (wie Natrium und Kalium) oder sind durch ihren Einbau in Enzyme Bestandteil von wichtigen Stoffwechselprozessen. So wird Eisen in Hämoglobin eingebaut und dient damit der Blutbildung. Kobalt ist das Zentralatom des Cobalamins, welches an der Synthese der DNA Basen beteiligt ist. [16] Doch nicht nur die nötige Aufnahme von Spurenelementen ist für die Medizin bei einigen Erkrankungen von Bedeutung. Das Einsatzgebiet von Metallen erstreckt sich weit über die Substitution hinaus.

Die vielseitige Verwendung von Metallen in der Medizin reicht einige tausend Jahre zurück. Bereits von den Menschen im Alten Ägypten wird vermutet, dass sie Wasser mit Kupfer sterilisiert haben und in Zeiten von Hippokrates (ca. 400 v. Chr.) soll Silber zur Wundheilung eingesetzt worden sein. [17] Goldtränke spielten bei den Alchimisten eine wichtige Rolle. [18] So wurde im 17. Jahrhundert eine „Aurum vitae“-Lösung, welche neben Gold auch Antimonsulfid enthielt, bei verschiedenen Leiden wie Syphilis, Epilepsie, Malaria und Krebs eingesetzt. [18] 1910 führte Paul Ehrlich die Behandlung mit Salvarsan, einem Arsenkomplex, gegen Syphilis ein. [19]

Robert Koch entwickelte Gold-Cyanide gegen den von ihm 1882 entdeckten Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis*. [20] Da man in den 1930er Jahren irrtümlicherweise davon ausging, dass die Rheumatoide Arthritis eine atypische Form der Tuberkulose sei, wurde diese durch den Arzt Jaques Forestier mit Gold(I)thiolaten behandelt. [21,22] Damit handelt es sich um die Vorreiter der heutigen DMARDs (Disease modifying antirheumatic drugs). In den 1970er entwickelte sich daraus Auranofin, ein Gold(I)phosphankomplex, welcher 1985 die Zulassung als orales Antirheumatikum erhielt. [23–25]

Einer der bekanntesten Vertreter der metallhaltigen Komplexe in der Medizin wurde durch Barnett Rosenberg 1967 zufällig entdeckt: Bei der Untersuchung des Bakterienwachstums unter Anlegen eines elektrischen Feldes stellte er die Inhibition des Wachstums fest. Die Ursache hierbei fand sich in den verwendeten Platinelektroden. [26–28] Weitere Forschungen führten zu der Entwicklung von Cisplatin. Auch wenn das Molekül bereits 100 Jahre zuvor bekannt war, erkannte erst Rosenberg die zytotoxischen Eigenschaften und das Potenzial dieser Verbindung. Cisplatin wurde 1978 offiziell zugelassen und ist heute eines der häufigsten eingesetzten Zytostatika als Mono- oder Kombitherapeutikum bei der Behandlung von Zervix-, Blasen-, Hoden- und Kopf-Hals-Karzinomen. [29,30] Im wässrigen Medium wird Cisplatin zu den sehr viel reaktiveren Aquakomplexen hydrolysiert, welche kovalent an das elektronenreiche N7-Stickstoffatom im Guanin in der DNA binden, wodurch es zu Quervernetzungen und letztendlich zu Strangabbrüchen der DNA kommt. [22] Ein großes Problem stellen die Resistenzentwicklungen einiger Krebsarten und das Nebenwirkungsprofil dar. Mit Nephro-, Neuro-, und Ototoxizität sind diese nicht ganz unerheblich, woraufhin weitere Platinkomplexe entwickelt wurden. [17,22] Carboplatin gehört der Gruppe der zweiten Generation an, bei der die Chlorido-Liganden gegen Cyclobutan-1,1-dicarboxylat als Abgangsgruppe ausgetauscht und dadurch die Wasserlöslichkeit des Komplexes erhöht werden konnte. [31] Der Hydrolyse Prozess zum wirksamen Aquakomplex findet deutlich langsamer als bei Cisplatin statt, wodurch die Reaktivität des Moleküls herabgesetzt wurde. [32] Zudem ist Carboplatin inerte gegenüber Thiolaten, wodurch die Nebenwirkungen deutlich geringer ausfallen. [22,31] Jedoch wurde eine häufige Myelotoxizität beobachtet. [30] Nedaplatin besitzt ein ähnliches Toxizitätsprofil wie Cisplatin, ist allerdings nur in Japan zugelassen. [32]

Oxaliplatin ist ein Vertreter der dritten Generation der Platinkomplexe, der 2002 weltweite Zulassung erhalten hat. [22] Im Vergleich zu Cisplatin wurden die Aminofunktionen gegen Diaminocyclohexan ausgetauscht. [33] Zugelassen ist Oxaliplatin in Kombination mit 5-Fluorouracil und Folinat zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms, eine der häufigsten Krebsarten, welche auf die Therapie von Cisplatin oder Carboplatin nicht anspricht. [32,34]

Lobaplatin und Heptaplatin sind weitere Stoffe der dritten Generation, welche aber nur eine regionale Zulassung in China u.a. zur Behandlung metastasierenden Brustkrebs, bzw. Südkorea bei Magenkarzinom, erhalten haben. [32]

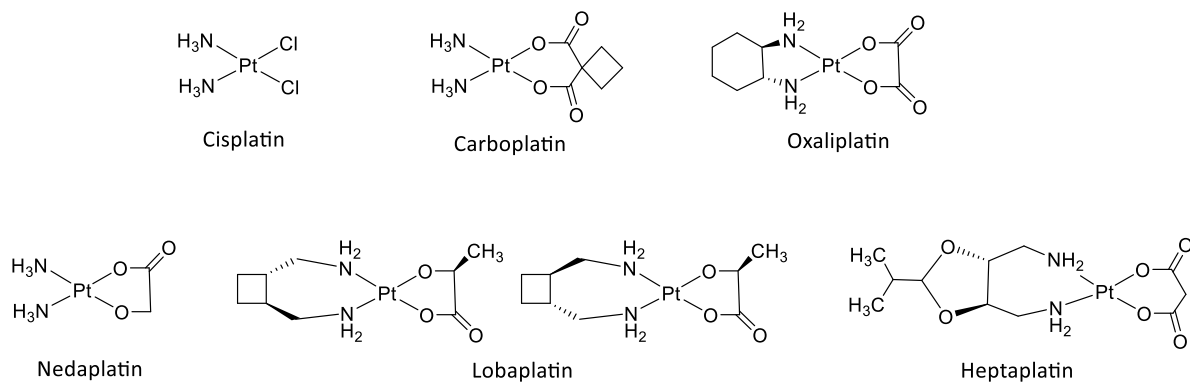


Abb. 3: Weltweit zugelassene Platinkomplexe (1. Reihe) und regional zugelassene Platinkomplexe (2. Reihe), nach [34].

Die antibiotische Wirksamkeit von Silber ist bekannt und so befinden sich silberhaltige Wundauflagen oder mit Silber beschichtete Katheter im Handel. Mittlerweile lassen sich auch in einigen technischen Geräten Silbernanopartikel finden, die so die Geräte sanitisieren sollen. Silbersulfadiazin ist antibakteriell wirksam und als topische Anwendung bei Verbrennungen seit 1974 zugelassen. [35]

Es gibt aber auch zahlreiche weitere Metalle, die den Weg in die Medizin gefunden haben: Strontiumranelat ist bei Osteoporose zugelassen, da es den Knochenumbau erhöht und die Knochenresorption verhindert. [36] Die Auswirkung von Lithium auf psychisches Verhalten wurde 1949 vom australischen Psychiater John Cade entdeckt und wird heute noch zur Behandlung von bipolaren Störungen eingesetzt. [37] Antimon ist als fünfwertiges Ion in *N*-Methylglucaminantimonat zur Behandlung der parasitären Infektionskrankheit Leishmaniose zugelassen. [38] Aufgrund der starken Nebenwirkungen stellt es allerdings nur noch ein Reservemedikament dar. [39] Bismutsalze werden bei dyspeptischen Beschwerden eingesetzt und sind Teil einer Eradikationstherapieform des Keims *Helicobacter pylori*. [22]

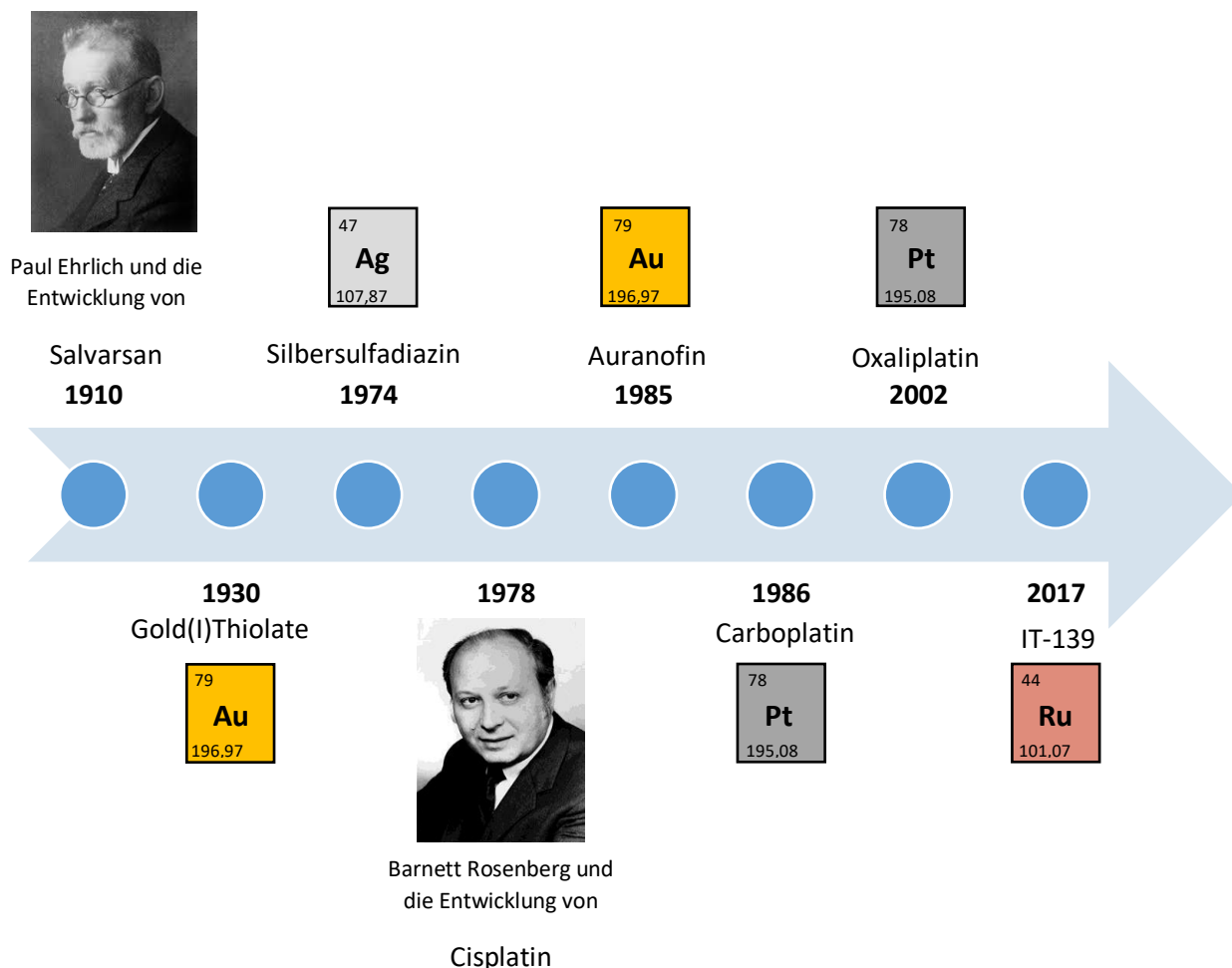
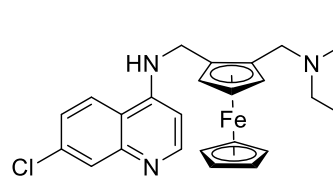


Abb. 4: Zeitstrahl der Entwicklung der in der Medizin eingesetzten Metallkomplexe der letzten Jahrzehnte. [40,41]

Dennoch liegt der Hauptfokus der Forschung an Metallkomplexen im Indikationsgebiet der Chemotherapeutika, vor allem in der Krebsforschung. Seit der Entdeckung von Cisplatin und der entsprechenden Weiterentwicklungen hat sich das Gebiet der anorganischen und organometallischen Komplexe immens ausgeweitet. Die Metallkomplexe bieten dabei eine große strukturelle Vielfalt mit Metallatomen in niedrigen Oxidationsstufen von Titan, Eisen, Ruthenium, Silber oder Osmium, bis Gold. [42] Zahlreiche Strukturen erreichten klinische Studien, aber bisher erhielt keine davon eine Arzneimittelzulassung. So zeigte der Titankomplex Titanocendichlorid hohe Aktivität bei Lungen- und Brustkarzinom in *in vivo* Modellen, jedoch wurde die klinische Studie aufgrund nicht ausreichender Ergebnisse abgebrochen. [22,42] Ferroquin ist ein Ferrocen-Derivat, welches sich in klinischen Studien als Einsatz bei Malaria behauptet. [42] Auch für Auranofin wurde das Indikationsgebiet ausgeweitet und das Molekül als Zytostatikum untersucht. Derzeit befindet es sich nicht nur in klinischen Studien zum Einsatz bei verschiedenen Krebsarten, sondern auch bei unterschiedlichen parasitären Erkrankungen wie Trichomoniasis. [25,43]



Ferroquin

Abb. 5: Weitere eingesetzte Metallkomplexe in der Medizin: Auranofin, Titanocendichlorid und Ferroquin.

1.2.1 Ruthenium-Komplexe auf dem Weg in die klinischen Studien

Neben den vorgestellten Rutheniumkomplexen befinden sich auch noch Ruthenium(II)-Polypyridyl-Photosensitizer in klinischen Studien, auf die in diesem Rahmen jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. [48]

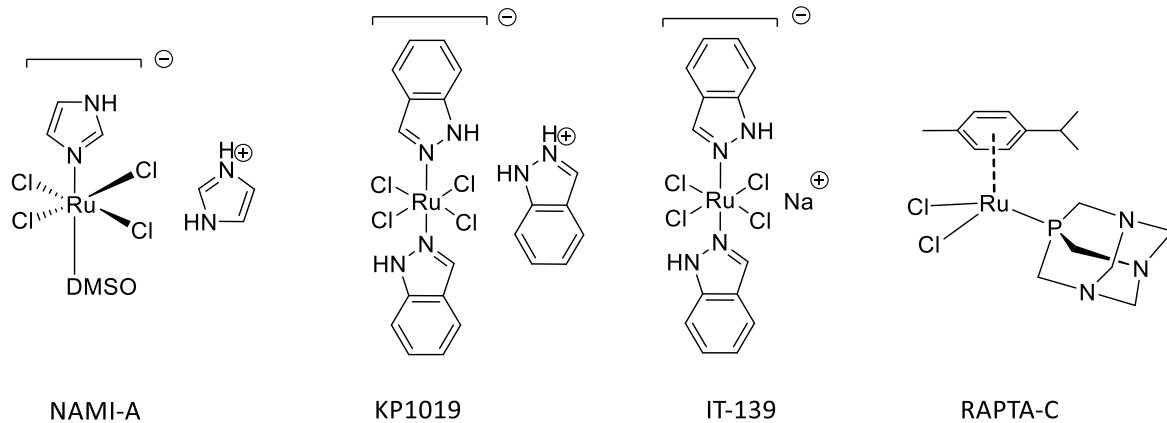


Abb. 6: Die bekanntesten Rutheniumkomplexe in der Krebsforschung: NAMI-A, KP1019, IT-139 und RAPTA-C.

Für die Rutheniumkomplexe konnte nicht nachgewiesen werden, dass sie über den gleichen Mechanismus wie Cisplatin wirken. [30] Da sich die Rutheniumkomplexe chemisch stark unterscheiden, lässt sich bisher kein allgemeiner Wirkungsmechanismus formulieren, jedoch haben alle starke Proteinbindungseigenschaften und Proteininteraktionen gemeinsam. Die Ruthenium(III)-komplexe zeichnen sich im Gegensatz zu Cisplatin, das quadratisch planar vorliegt, durch eine oktaedrische Struktur aus. [45] Während es sich bei KP1019, bzw. IT-139 und NAMI-A um eine Koordinationsverbindung handelt, in denen Ruthenium die Oxidationsstufe +III besitzt, ist RAPTA-C eine organometallische Verbindung mit Ruthenium in der Oxidationsstufe +II. [49]

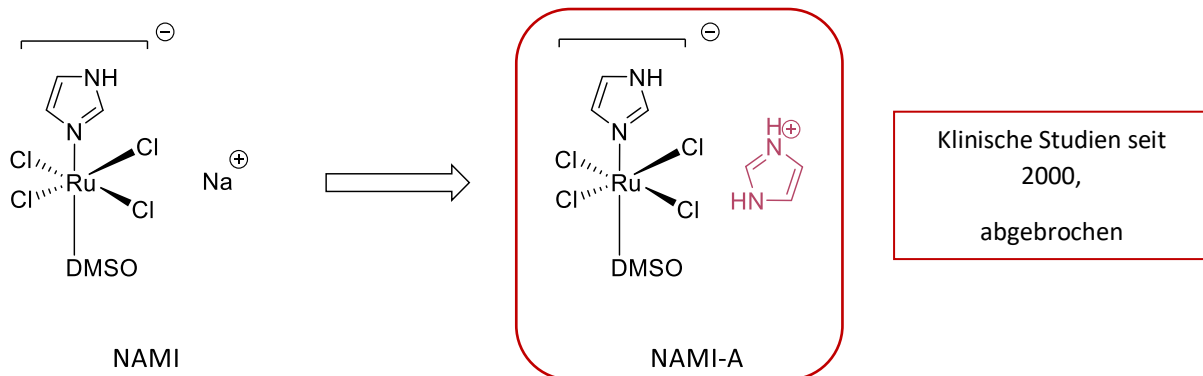


Abb. 7: Entwicklung des Rutheniumkomplexes NAMI-A.

NAMI-A ist der erste Rutheniumkomplex, der in klinischen Studien am Menschen getestet wurde. [50] Entwickelt wurde er von Mestroni und Sava aus der Vorgängerstruktur NAMI (siehe Abb. 7). [50] Dabei wurde das Natriumsalz gegen ein Imidazoliumsalz ausgetauscht, wodurch eine erhöhte Wasserlöslichkeit und höhere Stabilität an Luft erzielt werden konnte. [30] Weitere NAMI-Komplexe die deutlich lipophiler waren, zeichneten sich durch eine höhere Zellaufnahme und stärkere Zytotoxizität aus. [50] Diese konnte bei NAMI-A in Tiermodellen nicht festgestellt werden. Es ist 1000-fach weniger toxisch als Cisplatin und konnte vor allem durch seine antimetastasierenden

Eigenschaften überzeugen, wodurch sich auch der Name des Komplexes herleiten lässt (NAMI: Novel-antitumor Metastasis Inhibitor). [30,51] Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher nicht festgestellt werden. Eine Bindung an DNA und RNA wurde in Testungen nachgewiesen, jedoch erfolgt diese erst bei weit höheren Dosen, als sie für die antimetastasierende Wirkung notwendig sind. [50] Die antimetastasierenden Eigenschaften sind in der Krebstherapie oft von großer Bedeutung, da der Primärtumor chirurgisch oder durch Strahlentherapie entfernt werden kann. [50] Im Jahr 2000 wurde NAMI-A für klinische Studien ausgewählt. [51] Getestet wurde die Verbindung an nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLS) in Kombinationstherapie mit Gemcitabin. Die First Line Therapie sieht Gemcitabin und Cisplatin vor, welches in den Studien gegen NAMI-A ausgetauscht wurde. [50] In der Phase II zeigte sich keine Überlegenheit von NAMI-A, weshalb die Studien abgebrochen wurden. [50] Zudem kam es bei höheren Dosen zu den schmerzhaften Blasenbildungen an Händen und Füßen. [52]

Die Arbeitsgruppe um Professor Keppler entwickelte bereits in den 1980er Jahren, noch vor der Entwicklung von NAMI-A, vielversprechende Ruthenium(III)-azol Komplexe, wie KP418 (siehe Abb. 8). [30] Während bei NAMI-A die antimetastasierenden Eigenschaften im Fokus stehen, stellt die Leitstruktur KP418 ein Molekül dar, welches das Wachstum des Primärtumors bei kolorektalen Karzinomen inhibiert. [30,53] Es führte allerdings auch bei 10 % der Patienten zum Tod. [30,53] Die gravierenden Nebenwirkungen wurden durch die Weiterentwicklung KP1019, ein Indazolkomplex, reduziert und der Komplex war seit 2003 in klinischen Studien vertreten. [22] KP1019 ist deutlich zytotoxischer als NAMI-A, da eine stärkere Zellaufnahme, vermutlich durch passive Diffusion, zugrunde liegt. [48,54]

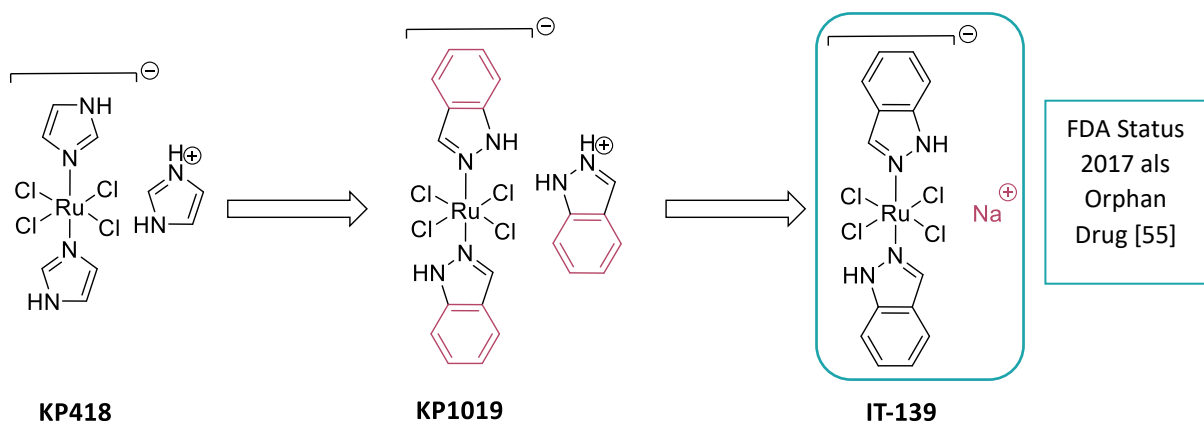


Abb. 8: Strukturelle Entwicklung des Rutheniumkomplexes IT-139.

Die Ergebnisse der klinischen Studien waren vielversprechend, jedoch konnte die MTD (maximum tolerated dose = maximal tolerierte Dosis) von KP1019 aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht festgestellt werden. [30] Der Austausch des Indazol- zum Natriumssalz führte letztendlich zur Weiterentwicklung IT-139, wodurch die Wasserlöslichkeit des Komplexes um das 35-fache erhöht

werden konnte und die Dosisproblematik behoben wurde. [45,55] Auch dieser Komplex zeichnet sich durch umfangreiche Proteinbindungseigenschaften aus. [45] Vermutet wird, dass der Komplex in den hypoxischen Tumorzellen zu Ruthenium(II)-Komplexen reduziert wird, und damit dem sog. „Activation by reduction“ Mechanismus unterliegt. [48] Allerdings wurde schon gezeigt, dass NAMI-A und KP1019 nicht reduziert werden, während sie an Serumproteine gebunden sind. Es gibt also bisher keinen Evidenz-basierten Nachweis, dass die Reduktion *in vivo* tatsächlich stattfindet. [50] IT-139 zeigt gute Proteinbindungseigenschaften und Akkumulation in Lysosomen, Zellaufnahme durch Protein-Konjugate, Bildung von ROS und Einleitung der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg. [52] Es ist der einzige Rutheniumkomplex der sich noch in klinischen Studien befindet. [30] 2017 wurde ihm der Status als Orphan Drug zur Behandlung des Prostatakarzinoms von der FDA verliehen. [56]

Durch die „Activation by reduction“ Hypothese wurden in den 1990er Jahren Rutheniumkomplexe in der Oxidationsstufe +II entwickelt, um den Reduktionsschritt zur Aktivierung zu umgehen. [30] RAPTA-C ist ein amphiphiles Molekül. [48] *In vivo* zeichnet sich der Komplex durch eine hohe selektive Zytotoxizität an malignen Zellen aus. [30] Es konnten bereits Addukt-Formationen mit Histonproteinkernen im Chromatin, anti-angiogenetische und antimetastasierende Eigenschaften, sowie die Einleitung der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg nachgewiesen werden. [48,57,58] Das Molekül befindet sich zurzeit in der präklinischen Entwicklung und hat die klinischen Studien bisher noch nicht erreicht.

1.3 Chemische Grundlagen der *N*-heterozyklischen Carben-Rutheniumkomplexe

1.3.1 Chemische Grundlagen *N*-heterozyklischer Carbene

Bei Carbenen handelt es sich um Verbindungen, in denen der Kohlenstoff ein Elektronensextett besitzt, sodass zwei nichtbindende Elektronen am Kohlenstoff verbleiben. [59] Sie galten lange Zeit als sehr reaktive und nicht stabile Moleküle. [60]

Aus zwei Wasserstoffen und einem Kohlenstoff bestehend, stellt Methylen das einfachste Carben dar, welches eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Benzin spielt. [61] Methylen ist linear aufgebaut, da es im Triplettgrundzustand vorliegt. [61] Die ersten Forschungen an Carbenen fanden bereits im 19. Jahrhundert statt und gehen auf den Forscher J.B. Dumas zurück, der durch die Dehydrierung von Methanol das erste Carben erzeugte. [62] Mitte des 20. Jahrhunderts nahm die Forschung mit Wanzlicks Bericht über die α -Eliminierung von Chloroform ihren Lauf, mit dem großen Ziel, ein freies Carben isolieren zu können, das jedoch nicht in befriedigendem Maß erreicht werden konnte. [61,63]

Einen großen Sprung in der Forschung und Entwicklung von Carbenen stellte die Isolierung eines freien Carbens durch Arduengo et al. im Jahr 1991 dar. [64] Durch die Deprotonierung von Imidazoliumsalzen konnte das erste stabile *N*-heterozyklische Singulett-Carben gewonnen werden. [59] In den Jahren darauf nahm die Bedeutung von NHC-Liganden in Organometallkomplexen deutlich zu. [60] Auch wenn NHCs isolierbar sind, stellen sie doch immer noch empfindliche Verbindungen dar. [60]

Carbene können zwei unterschiedlichen Grundzustände einnehmen (siehe Abb. 9): Bei den Singulett-Carbenen nehmen die nichtbindenden Elektronen einen antiparallelen Spin ein. Beide Elektronen befinden sich in einem Orbital, wodurch sich eine gewinkelte Molekülstruktur ergibt. [61] Demgegenüber stehen die Triplett-Carbene mit einem parallelen Spin der Elektronen, die sich in zwei unterschiedlichen Orbitalen aufhalten und daher linear konfiguriert sind. [61]

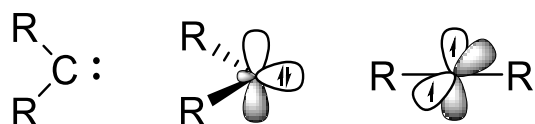


Abb. 9: Carbene: Singulett-Carben mit antiparallelem Spin und Triplett-Carben mit parallelem Spin.

Singulett-Carbene werden durch ein oder zwei Heteroatome stabilisiert. Stellen beide Heteroatome Stickstoffe dar, handelt es sich um *N*-heterozyklische Carbene. Die Stickstoffe üben dabei einen negativen induktiven Effekt aus, wodurch die Energie des besetzten σ -Orbitals und die Nukleophilie des Kohlenstoffes erniedrigt wird (siehe Abb. 10). [65,66] Zeitgleich sind die freien Elektronenpaare des Stickstoffes auch über das π -Orbital des Kohlenstoffes Mesomerie-stabilisiert (π -Resonanzwechselwirkung), wodurch sich ein stark nukleophiles Carben ergibt (siehe Abb. 10). [65,66] NHCs fungieren damit als Lewis-Basen, wobei durch Bindung an Übergangsmetalle, die als Lewis-Säuren reagieren, besonders stabile Metallkomplexe entstehen können. [60,66]

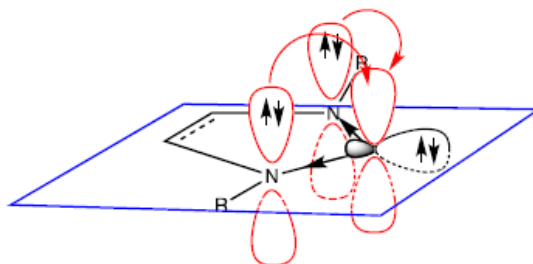


Abb. 10: Stabilisierung in *N*-heterozyklischen Carbenen durch elektronenziehende Effekte auf das besetzte σ -Orbital (schwarze Pfeile) und elektronenschiebenden Effekte auf das unbesetzte π -Orbital (rote Pfeile). [65]

Solche Carbenkomplexe lassen sich in zwei Typen unterteilen: die Fischer- und Schrock-Carbene. Das Fischer-Carben geht auf die Entdeckung von Fischer et al. im Jahr 1964 zurück. [67] Bei dem Fischer-Carben, einem Singulett-Carben, trägt der carbenoide Kohlenstoff ein Heteroatom. [68] Fischer-

Carbene binden vorzugsweise an späte Übergangsmetalle mit niedrigen Oxidationsstufen. [68] Die Schrock-Carbene wurden durch Richard Schrock 1974 entdeckt. [69] Grundlage bildet hier ein Triplett-Carben, welches an frühe Übergangsmetalle mit hohen Oxidationsstufen bindet. [68]



Abb. 11: Darstellung der Metall-Carbenbindung im Fischer-Carben (links) und Schrock-Carben (rechts).

In metallorganischen Komplexen liegt die Metall-Kohlenstoffbindung polarisiert vor, wobei die positive Ladung beim Fischer-Carben formal dem Kohlenstoff zugeteilt wird, dem dadurch ein elektrophiler Charakter verliehen wird. [68,70] Beim Schrock-Carben ist genau das Gegenteil der Fall, da der Carben-Kohlenstoff mit seiner negativen Polarisierung einen nukleophilen Charakter besitzt. [71] Bei den Fischer-Carbenen wird die Metall-Kohlenstoffbindung durch die Donoreigenschaften des Carbens und Rückbindung des Metalls in leere π -Orbital des Carbens gebildet. Bei den Schrock-Carbenen geht die Bindung gleichermaßen von Carben und Metall aus (siehe Abb. 11). [71] Damit können die NHCs (oder auch Arduengo-Carbene) in Metallkomplexen als Teil der Fischer-Carbene angesehen werden. [70]

In der heutigen Zeit spielen Carbene eine wichtige Rolle in der Übergangsmetallkatalyse. Die ersten Metallkomplexe wurden bereits durch Wanzlick und Öfele beschrieben, die bereits 1968 Quecksilber-Carben-Komplexe synthetisierten. [72] Hermann et al. revolutionierten dieses Forschungsgebiet durch den Einsatz von NHCs in der homogenen Katalyse, indem NHC-Palladiumkomplexe bei der Heck-Kupplung als Katalysatoren eingesetzt wurden. [73]

Weitere bekannte Metallcarbenkomplexe stellen die Grubbs-Katalysatoren dar. Sie werden in der Olefin Metathese verwendet, welche eine wichtige Grundlage für verschiedene Herstellungsprozesse z.B. von Kunststoffen bilden. Bei Grubbs-Katalysatoren handelt es sich um verschiedene Ruthenium-Carbenkomplexe, die ab 1992 entwickelt wurden. [74] In der ersten Generation wurden Ruthenium-Phosphankomplexe verwendet, in der zweiten Generation *N*-heterozyklische Carbenkomplexe. [75] Der große Nutzen für die synthetische organische Chemie wurde 2005 mit Verleihung des Chemie Nobelpreises für Grubbs, Schrock und Chauvin geehrt. [76] Für die NHC-Grubbs-Katalysatoren konnten bereits Antitumor-Eigenschaften nachgewiesen werden. [77]

Heutzutage stellen Ruthenium-Metallkomplexe nach den Platinkomplexen die Metallkomplexe dar, die in der Medizin mit am stärksten erforscht werden. [50,78]

1.3.2 Ruthenium-Aren-Komplexe

Ruthenium ist mit der Ordnungszahl 44 Bestandteil der Platingruppenmetalle. [79] Als Übergangsmetall findet es sich in der Gruppe 8 unter Eisen und über Osmium wieder. [80] Die häufigsten Oxidationsstufen sind +II und +III, auch Oxidationsstufe +IV ist möglich, wobei die Komplexe aber häufig instabil sind. [80,81] Ruthenium ist ein hartes, silberweiß gefärbtes Metall, welches in Südafrika, Nord- und Südamerika vorkommt. [79] Den größten Einsatz findet es in der Katalyse, wird aber immer verstärkter auf biologisch aktive Formen in der Forschung untersucht.

Auch wenn Ruthenium häufig ähnliche Eigenschaften wie Eisen aufgrund der Anordnung im PSE nachgesagt werden, stimmen nur die möglichen Oxidationsstufen und oktaedrische Geometrie der beiden Atome überein. So ist der Ionenradius von Ruthenium(III) deutlich größer, Ruthenium besitzt deutlich weichere Eigenschaften und ist inerte als Eisen. [50]

Ruthenium ist sechsfach-koordiniert. In Ruthenium(III)-Komplexen liegt eine oktaedrische Koordinationsgeometrie vor. Die thermodynamische und kinetische Stabilität von Ruthenium(III)-Komplexen ist geringer als von Komplexen in der Oxidationsstufe +II. [80]

Eine Gruppe der Rutheniumkomplexe stellen die Ruthenium-Aren Komplexe dar, welche sich durch amphiphile Eigenschaften auszeichnen. Sie bestehen aus einer hydrophoben Aren-Region, einem hydrophilen Ruthenium-Zentralatom in der Oxidationsstufe +II und unterschiedlichen Liganden, mit denen die Eigenschaften des Komplexes gesteuert werden können. Die Aren-Fragmente reichen hierbei von Benzen-, Dibenzol- zu *p*-Cymol- Resten. [80]

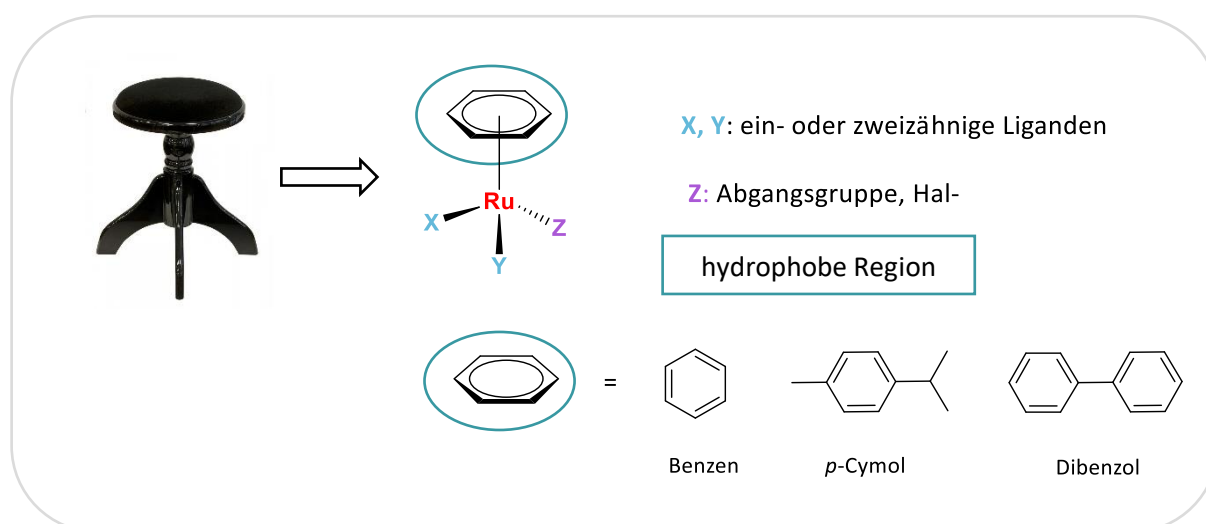


Abb. 12: Struktureller Aufbau der Ruthenium.-Aren Komplexe [80,82]

Der η^6 -Aren-Ligand bindet stark an das Rutheniumatom, wodurch der Ligand relativ inert gegenüber Dekomplexierung ist. [83] Der Zusatz η^6 bezeichnet die Haptizität des Aren-Liganden, die die Anzahl der Ligandenatome angibt, die direkt an das Zentralatom binden. Damit geht die Bindung des Arenrings an das Ruthenium gleichmäßig von allen Kohlenstoffatomen aus. Der Aren-Ligand besetzt die Hälfte der Koordinationsstellen des Rutheniums, womit drei weitere Bindungen verbleiben und drei weitere Liganden in das Molekül eingefügt werden können. [83] Damit nehmen diese Art von Komplexen eher eine „Pseudo-oktaedrische“ Struktur ein. [80] Die räumliche Anordnung der vier Liganden um das Rutheniumatom erinnert an eine tetraedrische Struktur. In der Literatur wird der Aufbau der Komplexe als Klavierstuhl („piano stool“) beschrieben, wobei der Aren-Ligand die Sitzfläche und die drei koordinativ-gebundenen Liganden um das Rutheniumzentrum die Beine darstellen (siehe Abb. 12). [84]

Die Koordinationsstellen X und Y können hierbei von ein- oder zweizähligen Liganden besetzt sein. [80] Bei Ligand Z handelt es sich häufig um eine Abgangsgruppe, z.B. einen Halogenido-Liganden. Die Größe, Lipophilie und Ladung des Komplexes lassen sich über die Liganden steuern. [83] Auch die Interaktionen mit Biomolekülen lassen sich über den Ligandenaufbau modifizieren. [81] Das hydrophobe Aren-Fragment steuert zur Lipophilie des Moleküls und damit zur erhöhten Zellaufnahme bei. [80,84,85] Der Ligand Z ist sehr hydrolyse-empfindlich. [80]

Die RAPTA Moleküle bilden die Entwicklungsgrundlage der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe. Auch sie besitzen die räumliche Anordnung des „piano stool“ (siehe Abb. 13). [86] Die drei koordinativen Seiten werden durch den PTA-Liganden und zwei Chlorido-Liganden besetzt. Der PTA-Ligand zeichnet sich hierbei als hydrophiler Ligand aus, wodurch die Wasserlöslichkeit des Komplexes gewährleistet wird. [86]

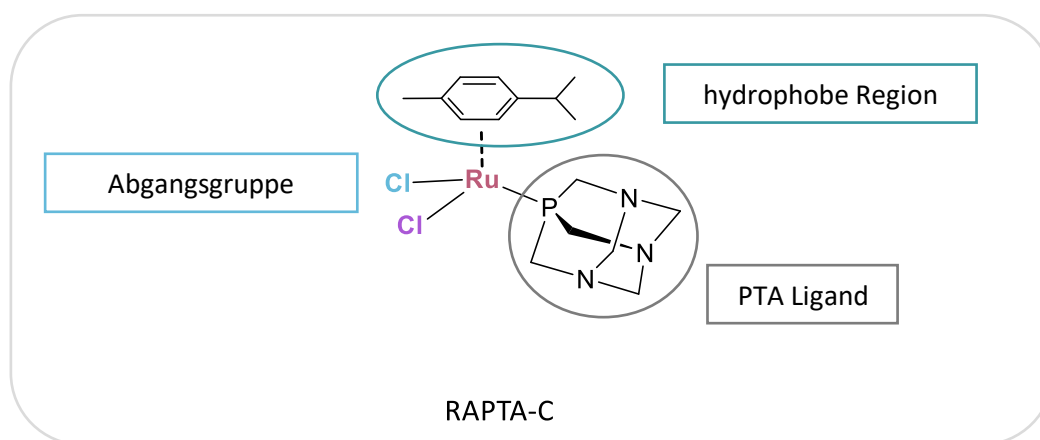


Abb. 13: Chemische Grundstruktur des RAPTA-C Moleküls.

Es ergeben sich zahlreiche strukturelle Entwicklungsmöglichkeiten, da sich durch einfache Modifizierungen die biologischen Eigenschaften ändern lassen. So wurden bereits klinisch geprüfte Strukturen an die Ruthenium-Aren Komplexe gekoppelt, um so das Anwendungsgebiet zu erweitern, wie z.B. antibakteriell wirkende Chinolone oder antifungale Strukturen wie Pyrithion. [4,87] Durch die Bindung des Ruthenium-Fragments an NHC-Liganden kann über die Metall-Carben-Bindung ein stabiler Metallkomplex mit vielversprechenden biologischen Eigenschaften erhalten werden. [70]

1.4 Mögliche biologische Targets von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen

Das größte Forschungsgebiet der Rutheniumkomplexe liegt im Bereich der Chemotherapeutika, weshalb im Folgenden die Entstehung von Krebs im Allgemeinen und gezielte biologische Zielstrukturen als potenzielle Targets der Rutheniumkomplexe erläutert werden.

1.4.1 Entstehungsmechanismen von Krebs

Die Malignität eines Tumors ist durch ein unkontrolliertes, infiltrierendes, destruierendes und metastasierendes Wachstum gekennzeichnet. Die Regulation der Zellteilung erfolgt durch komplex geschaltete Signalwege. Bei einer Fehlschaltung dieser Signalwege und Verlust der Kontrolle der Proliferation, kann eine Zelle entarten. [88] Dabei können verschiedene Mechanismen fehlgeleitet sein, die so zur Entartung der Zelle führen (siehe Abb. 14). [89]

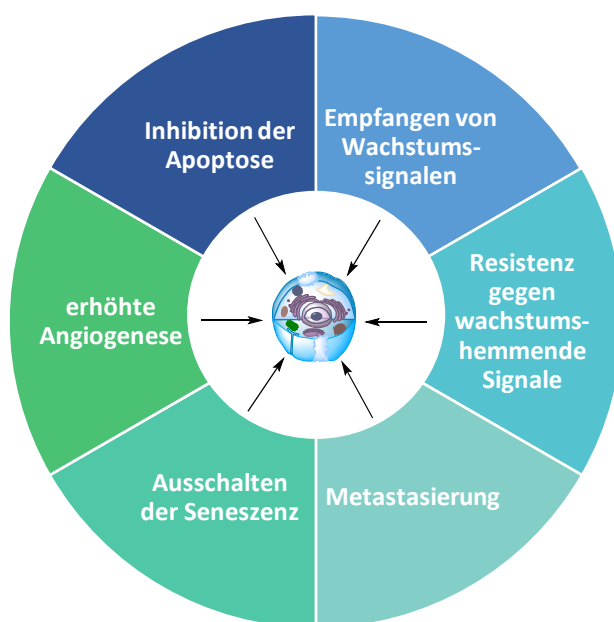


Abb. 14: Wirkmechanismen, die zur Entartung einer Zelle führen können. [89]

Die Angiogenese bildet die Grundlage für invasives Wachstum von Tumoren. Nur durch Gefäßneubildungen kann die Sauerstoffzufuhr von den Zellen gewährleistet und Apoptose unterdrückt werden. Ein wichtiger Faktor in der Angiogenese ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF. Bei Sauerstoffmangel wird HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) gebildet, welcher die Expression von VEGF verstärkt, wodurch letztendlich die Angiogenese vorangetrieben wird. [88]

Die meisten Tumore werden erst durch die starke Metastasierung in andere Gewebe besonders gefährlich. Zuerst kommt es zur Intravasation, bei der der tumoröse Zellverband in die Gefäße einwandert. Darauf folgt der Transport über das Blut- oder Lymphsystem, ehe das Tumorgewebe aus den Gefäßen austritt (Extravasation). Die Überwindung zahlreicher biologischer Barrieren erfordert die Hilfe von proteolytischen Enzymen, den sog. Matrix-Metalloproteasen (MMP). Bei dem Prozess der Metastasierung ist ein weiterer Botenstoff beteiligt: TGF- β . Dieser spielt auch für die Zellzyklus-Kontrolle eine Rolle (Arrest G1), fördert die Angiogenese und ist an der Produktion extrazellulärer Membranproteine beteiligt. [88]

1.4.1.1 Onkogene

Eine häufige Ursache für die Entstehung von Krebs stellen genetische Veränderungen und die Beteiligung von Onkogenen dar. Proto-Onkogene codieren die Biosynthese von Proteinen, welche die Zellteilung und Wachstumsregulation fördern. Tumorsuppressorgene hingegen codieren die Biosynthese der Proteine, welche letztendlich unkontrollierte Zellteilung unterdrücken. [90] Erst die Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen, durch die Onkogene gebildet werden, führen zu entartetem Zellwachstum. [91] Die Mutationen der Proto-Onkogene können hierbei an unterschiedlicher Stelle auftreten. Eine Punktmutation in der Promotorregion führt zu einer erhöhten Transkription dieses Gens. Durch die Amplifikation eines Genombereichs wird die Bildung eines Proto-Onkogens unphysiologisch erhöht. Dabei werden trotz Bildung eines Produkts, welches dem einer gesunden Zelle entspricht, durch die gesteigerte Gen-Synthese vermehrt Onkogene gebildet. [88,91]

Die Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen kann durch exogene Faktoren wie UV-Licht oder chemische Kanzerogene ausgelöst werden. [88] Die Onko-Gene können aber auch als „Achilles-Sehne“ der Krebszellen dienen. So codiert das Onkogen „HER2-neu“ die Informationen zur Synthese des Wachstumsfaktorrezeptors HER2, welcher beim Mammakarzinom stark überexprimiert wird. [92] Durch die Einbeziehung biotechnologischer Methoden und der damit möglich gewordenen Herstellung von sogenannten Biologicals konnte der rekombinant hergestellte Antikörper Trastuzumab entwickelt werden, welcher gezielt den HER2-Rezeptor inhibiert und damit das unkontrollierte Wachstum bei HER2-positiven Brustkrebs verhindern kann. [90,92]

1.4.1.2 Kontrollmechanismen der Zellteilung

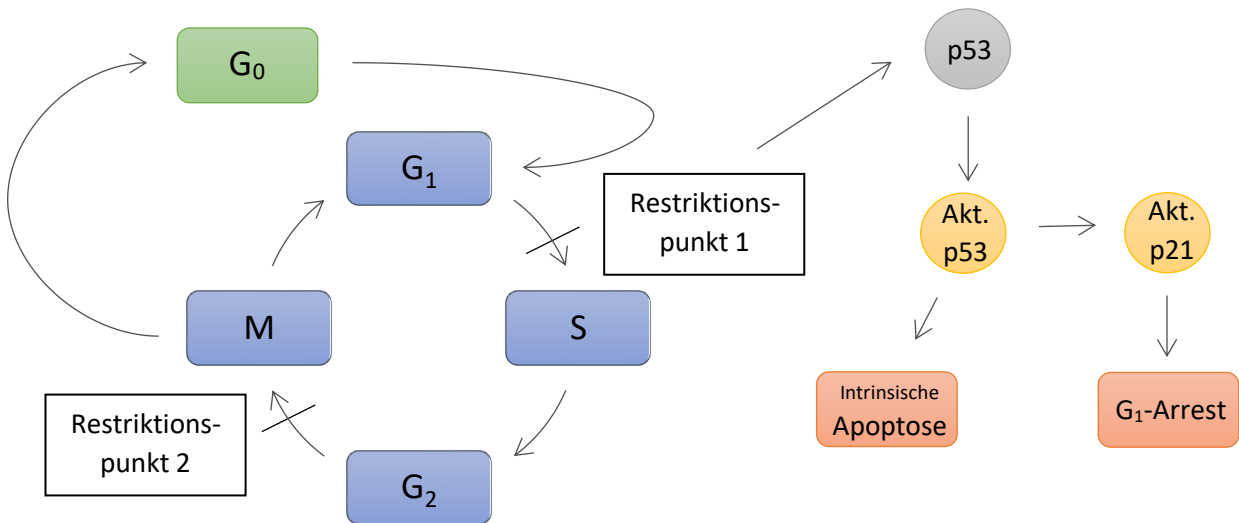


Abb. 15: Schematische Darstellung der Kontrollmechanismen der Zellteilung, (akt. = aktiviertes).

Um die Mechanismen der Entartung von Krebszellen und letztendlich die Angriffspunkte in der Zytostatikatherapie besser zu verstehen, muss man sich den Zellzyklus genauer vor Augen führen. Der Zellzyklus einer Zelle unterteilt sich in M-Phase, in der die Mitose und Cytokinese der Zelle stattfindet, und die Interphase, welche die Zelle auf die Cytokinese vorbereitet. [88] Die Interphase wiederum unterteilt sich in mehrere Phasen. Sie beginnt in der G₁-Phase, in der die Zelle weiterwächst und normale Funktionen ausübt. [88] Daraufhin findet die S-Phase statt, in der die Replikation der DNA durchgeführt wird. Im Anschluss folgt die G₂-Phase mit Synthese von ausschließlich mitosewichtigen Enzymen und Strukturproteinen. (z.B. des Spindelapparats) [88] Es befindet sich immer nur ein Teil der Zellen im Zellzyklus. Die Zellen, die keine Zellteilung durchlaufen, verweilen in der Ruhephase G₀. [93,94] Durch positive Regulatoren wird der Zellzyklus voran getrieben. Cyclin-abhängige Kinasen (CdK, cyclin dependent kinase), welche durch Cycline gesteuert werden, spielen für jede Phase des Zellzyklus eine Rolle. [88,95] So bindet Cyclin E an die cdk2 und aktiviert diese, wodurch der Eintritt in die S-Phase gefördert wird. [95]

Der Zellzyklus unterliegt mehreren Kontrollmechanismen, damit die Zellteilung ohne Fehler abläuft. Zur Kontrolle der Mechanismen dienen zwei Restriktionspunkte, welche sich am Übergang von der G₁- zur S-Phase befinden (Checkpoint 1), bzw. am Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase (Checkpoint 2). Der erste Checkpoint wird im Wesentlichen durch das Protein p53 kontrolliert. Es gehört zu den Tumorsuppressorproteinen, einem Produkt des p53-Tumorsuppressorgens und stellt damit einen negativen Regulator des Zellzyklus dar. Durch verschiedene Freischaltungen von Reaktionskaskaden ist es in der Lage, am Restriktionspunkt 1 den Zellzyklus solange zu unterbrechen,

bis DNA-Schäden behoben wurden (G_1 -Arrest) oder die Apoptose einzuleiten und damit unkontrolliertes Zellwachstum zu unterdrücken. [96]

Diese Funktion läuft über eine Kaskade ab: p53 wird aktiviert, wodurch es das Protein p21 aktiviert. Dieses stellt einen Inhibitor von Cyclin E und cdk2 dar, wodurch die Zelle in der G_1 -Phase arretiert. [95] Gelingt die DNA Reparatur nicht, löst p53 die Apoptose über den intrinsischen Weg aus.

Die p53-abhängige Apoptose moduliert die zytotoxischen Effekte von zahlreichen Zytostatika, welche in die Signalkaskade eingreifen. Mutationen des p53-Gens können unterschiedliche Auswirkungen haben. Kommt es zu einem Verlust von p53, können sich Resistenzen gegen Chemotherapeutika ausbilden. Bei einer Überexpression von p53, kann die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika erhöht werden. [96] Jedoch zeichnen sich Tumorarten mit einer Punktmutation von p53 durch besonders bösartiges Wachstum und einer raschen Metastasierung aus. [88]

p53 wird häufig bei zellulärem Stress aktiviert, wodurch weiteres Zellwachstum verhindert wird. In Tumorzellen liegt vermehrt zellulärer Stress durch Hypoxie und Überwucherung vor, wodurch p53 verstärkt das Zellwachstum blockiert. Dies kann eine Ursache dafür sein, dass Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens gefördert und Resistenzen ausgebildet werden. [96] Bekannte exogene Faktoren, die die Punktmutation von p53 auslösen, stellen das Aflatoxin B1 und Tabakrauch dar. [88]

Zudem wirkt die TrxR1 (Thioredoxinreduktase 1) (siehe Kapitel 1.4.2) desaktivierend auf die Proteinkonformation des p53, wodurch die Apoptose induziert werden kann. [97]

1.4.1.3 Mechanismen des Zelltods

Alle Zytostatika haben den Zelltod als Ziel gemeinsam. Aber auch hier unterscheidet man zwischen verschiedenen Formen.

Die Apoptose stellt den programmierten Zelltod dar. Durch Fehlschaltungen und Inhibition der Apoptosemechanismen, kann die Entartung der Zelle stattfinden. [89] Die Apoptose bildet eine wichtige Funktionsrolle im Immunsystem und der Gewebemöostase und ist in eukaryotischen Zellen Caspase-vermittelt. Caspasen sind Cysteinproteasen, die in der Zelle als inaktive Procaspasen-Vorläufer vorliegen. Durch Oligomerisierung werden die Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert, welche wiederum die Effektor-Caspasen 3,6 und 7 freischalten. Diese führen nachfolgend zur Fragmentierung des Nukleus (siehe Abb. 16). [98]

Es gibt zwei unterschiedliche Apoptose-Signalwege. Der eine stellt den extrinsischen Weg dar. Dabei werden extrazellulär die „death receptors“ (Todesrezeptoren) auf der Zelloberfläche aktiviert und das

Signal intrazellulär weitergegeben. Das geschieht z.B. über den Fas-Liganden (Fas-L) am Fas-Rezeptor (Fas-R) oder über den Tumornekrosefaktor (TNF) am TNF-Rezeptor. Beide Ligand-Rezeptor-Interaktionen haben zur Folge, dass sich der DISC-Komplex formiert (=Death-induced signalling complexe) und letztendlich die Caspase-8 aktiviert wird. [99]

Der intrinsische Weg läuft intrazellulär ab. Ursachen für die Einleitung der intrinsischen Apoptose können z.B. zellulärer Stress, wie Hypoxie, aber auch DNA-Schäden (Apoptoseeinleitung über p53) oder Onkogen-Induktion darstellen. Alle Signale treffen in den Mitochondrien zusammen. Es kommt zur Permeabilisierung der äußeren Membran, wodurch das Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) stark abnimmt und letztendlich Cytochrom C und andere proapoptotische Moleküle aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Sobald das Cytochrom C freigesetzt ist, lässt sich die Apoptose nicht mehr stoppen. Es bildet sich das Apoptosom, welches ein großer Proteinkomplex aus Cytochrom C, APAF-1 (=apoptotic protease activating factor 1) und Caspase-9 ist. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 bewirkt, dass die Chromatine kondensieren, das Zytoskelett aggregiert und der Nukleus fragmentiert. [98] Morphologisch kommt es zu stark geschrumpften, kugelförmigen Zellen mit ausgestülpten Zellmembranen, da sich das Zellvolumen reduziert (Pyknosis) und die Pseudopodien retrahieren. [100] Die äußere Zellmembran bleibt bis kurz vor Ende des Prozesses intakt. [100]

Es gibt verschiedene Proteine, die den Signalweg modulieren. Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak bilden Poren in der Mitochondrienmembran, wodurch die Freisetzung von Cytochrom C gefördert wird. Das antiapoptotische Protein Bcl-2 hingegen steuert der Apoptose entgegen, indem es die Aktivität der proapoptotischen Proteine hemmt (siehe Abb. 16). [88]

Ein weiterer Apoptosemechanismus läuft über einen Kinase-vermittelten Signalweg ab (MAP-Kinaseweg): Dabei aktiviert die ASK1 (Apoptosis signal regulating kinase 1), eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K), diese schaltet den Kinase Signalweg über MAPK-Kinasen MKK3,4,6 und 7 frei. [101] Dabei wird die JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) über MKK4 und MKK7 aktiviert, welche aktivierend auf das proapoptotische Protein Bim wirkt und inhibierend auf das antiapoptotische Protein Bcl-2. Darüber hinaus aktivieren MKK4 und MKK6 das Protein p38, welches aktivierend auf das proapoptotische Enzym Bim wirkt. [101] Trx1 (Thioredoxin 1) kann an die N-Terminale nichtkatalytische Region von ASK1 binden. [102] Damit kann die Thioredoxinreduktase über diesen Weg den Apoptoseweg negativ beeinflussen. [101,102]

Neben der Freisetzung von Cytochrom C wird auch das Protein SMAC in das Cytosol freigesetzt. Dieses wirkt inhibierend auf IAP (Inhibitor of apoptosis), welches antiapoptotisch auf Caspase 3 und 9 wirkt. [101]

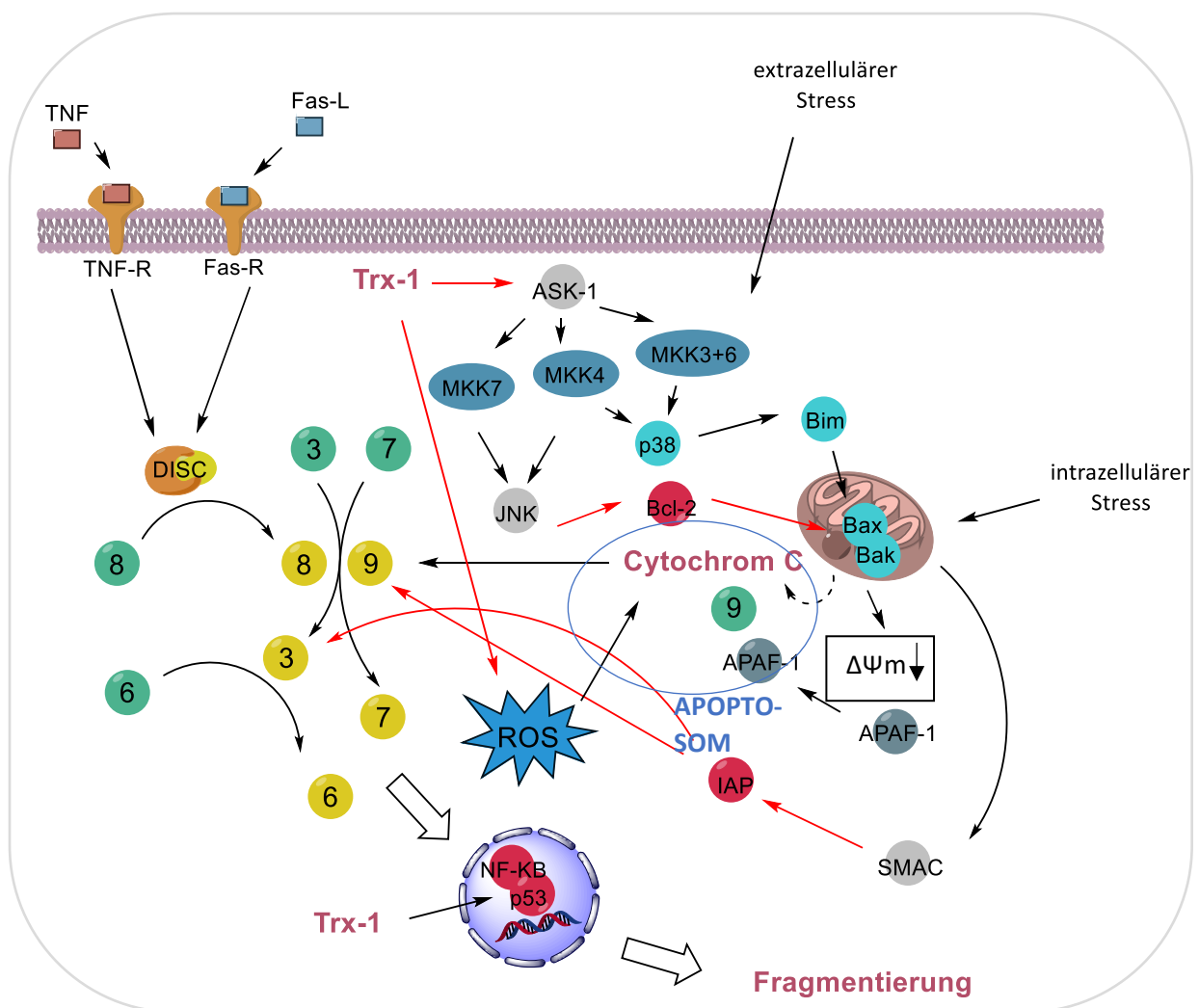


Abb. 16: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Signalkaskaden die zur Apoptose und damit zur Fragmentierung des Nukleus in der Zelle führen. Die grünen Kreise stellen die Vorläufer-Caspasen, die gelben die aktivierten Caspasen dar. Bei den roten Kreisen handelt es sich um antiapoptotische Proteine, bei den türkisfarbigen um proapoptotische Proteine.

Extrazelluläre Stressfaktoren, die die Apoptosemechanismen in Gang setzen, können die Minderung an Wachstumsfaktoren, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, sowie eine Immunantwort darstellen. Bei intrazellulären Stressfaktoren handelt es sich häufig um DNA-Schäden (z.B. Einleitung durch p53) oder eine Aktivierung durch Onkogene. Erst durch Überwindung dieser Stressfaktoren und Umgehung der Apoptoseantwort der Zelle, kann invasives, metastasierendes Wachstum und damit Krebs entstehen. [88]

Neben der Apoptose repräsentiert die Autophagozytose eine wichtige Art von Zelltod. Die Autophagosomen entkapseln das zytosolische Material, fusionieren mit Lysosomen, wodurch die Zellmaterialien abgebaut werden. Es tritt eine massive autophagische Vakuolisierung des Zytoplasmas ein. Sie wird ausgelöst durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren, wobei die Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3K) eine wichtige Schlüsselrolle im Signalweg spielt. Der Gegenspieler stellt die TOR-Kinase dar, welche die Autophagozytose negativ beeinflusst. [99]

Eine weitere Art des Zelltods stellt die Nekrose dar. Sie ist definiert als pathologischer, unregelter Zelluntergang, wenn keine Anzeichen der Apoptose oder Autophagozytose vorliegen. [100] Allerdings ist besonders charakteristisch, dass das Zellmaterial unkontrolliert freigesetzt wird, wodurch es zu Entzündungen im umliegenden Zellgewebe kommen kann. Die Apoptose hingegen findet innerhalb der Zellmembran statt, wodurch die Freisetzung von intrazellulären Komponenten verhindert wird. [103] Nekrose ist häufig eine Folge von pathophysiologischen Bedingungen wie Infektionen, Entzündungen und Ischämie. [99]

Die „Mitotic catastrophe“, wie sie in der Fachliteratur genannt wird, stellt ebenfalls eine Form des nicht programmierten Zelltodes dar. Sie wird als falsch regulierte Mitose beschrieben. Der Begriff ist leicht irreführend und sollte lieber als „Zelltod, der während der Metaphase auftritt“ benannt werden. [100] Es handelt sich hierbei um Stimuli während der M-Phase, die zum Absterben der Zelle beitragen. Der Vorgang dient vermutlich einem Mechanismus zur Stress-Bewältigung. [99]

Aber auch gemischte Apoptoseformen wurden bereits in der Literatur unter dem Begriff Aponekrose beschrieben. Es wird also ersichtlich, dass die Apoptose eine biochemische Einheit benennt, es jedoch auch zahlreiche Subtypen gibt und die Abgrenzung nicht immer ganz ersichtlich ist. [100]

1.4.2 Das Glutathion- und Thioredoxin-Redoxsystem

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) stellen Nebenprodukte der Atmungskette oder von Oxidasen dar. [104] Sie sind an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie Krebs oder kardiovaskulären Ereignissen beteiligt. [105] Deshalb sind Schutzmechanismen vor Entgleisung der Redoxhomöostase in einer Zelle unabdingbar. Die wichtigsten Systeme dafür bilden das Thioredoxin- und das Glutathionsystem.

Das Glutathionsystem besteht aus NADPH, der Glutathionreduktase (GR), Glutaredoxin und Glutathion (GSH). GSH stellt im Gegensatz zu Thioredoxin ein nicht proteinogenes Thiol in den Zellen dar. [106] Dieses System ist an der DNA-Synthese beteiligt, katalysiert die Reduktion von H_2O_2 und schützt damit die Zellen vor oxidativem Stress. [106] Zudem detoxifiziert es elektrophile Xenobiotika. [106] Von der Glutathionreduktase existieren zwei Formen, die Grx1 im Cytosol, welche in vielen zellulären Prozessen involviert ist und die Grx2, welche in den Mitochondrien und Nukleus lokalisiert und an der Regulation von Apoptosemechanismen beteiligt ist. [104,107]

Das Thioredoxsystem besteht aus NADPH, der Thioredoxinreduktase (TrxR) und dem Substrat Thioredoxin (Trx). [104] Die TrxR gehört, neben der GR und Lipoamiddehydrogenase, zur Familie der

Pyridin-Nucleotid-Disulfid-Oxido-Reduktasen der Flavoenzyme und liegt als dimerisches Flavoprotein mit einer Größe von 112-130 kDa vor. [108–110]

Es existieren drei Isoenzyme der TrxR. Die TrxR1 tritt im Cytosol oder Nukleus auf, die TrxR2 in den Mitochondrien. [107] Darüber hinaus gibt es noch die testikuläre TrxR3, bei der es sich um eine Trx-Glutathionreduktase handelt, welche sich in Spermatiden wiederfindet. [107,111]

Die humane TrxR stellt ein Selenoprotein dar. [109] Am N-Terminus bildet es die Sequenz: -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-Dithiol (CVNVGC). Sie besitzt am C-Terminus ihrer Aminosäuresequenz das aktive Zentrum mit der Sequenz: -Gly-Cys-Sec-Gly- (GCUG), wobei das Selenocystein für die reduzierende Aktivität verantwortlich ist. [106,109,112] Selenocystein hat einen pK_s -Wert von 5,3, wodurch es unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vorliegt. [106] Aufgrund dessen und der guten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums am C-Terminus besitzt die humane TrxR eine sehr breite Substratspezifität. [106,112]

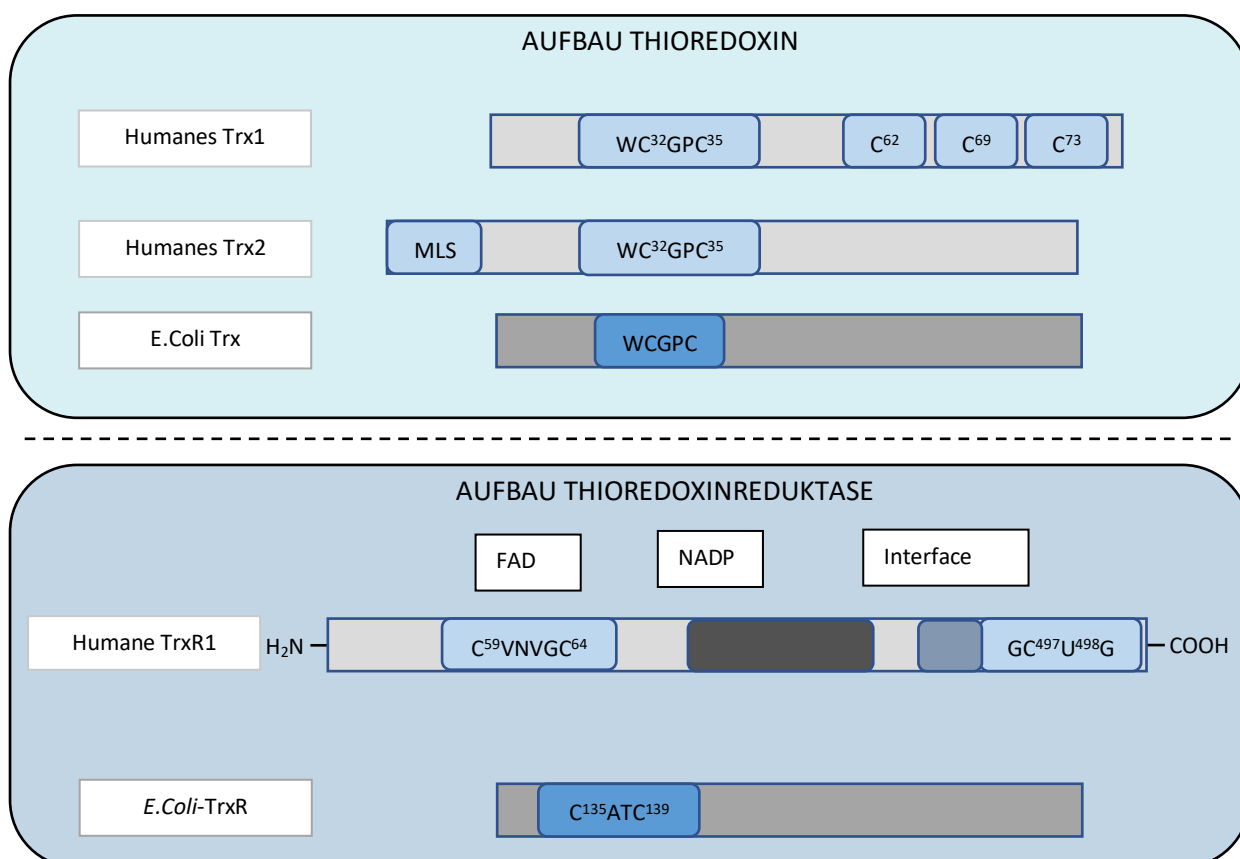


Abb. 17: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des Thioredoxins (oben) und der Thioredoxinreduktase (unten) von Säugetierzellen und Bakterienzellen im Vergleich, (MLS = mitochondrial localisation sequence).

TrxR1 und TrxR2 besitzen eine FAD- und NADPH-Bindungsdomäne und eine Interface-Domäne (siehe Abb. 17). [102] Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den beiden Untereinheiten in der Interface-Domäne, womit das Dimer die funktionelle Einheit des Enzyms darstellt. [113] Durch den C-Terminus

unterscheidet sich die TrxR auch von der GR, die dieses aktive Zentrum nicht besitzt. Der N-Terminus ist bei der GR identisch. [110]

Das Thioredoxin besitzt in allen Subtypen ein Disulfid als aktives Zentrum mit der Sequenz –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-(WCGPC) (siehe Abb. 17). Die Cysteinreste befinden sich dabei an den Positionen 32 und 35. Dabei besitzt das Cys³² den niedrigeren pK_s-Wert, wodurch dieses die Bindung mit Disulfid-Substraten eingeht. Zusätzlich sind im Trx1 Cysteinreste in Positionen 62, 69 und 73 enthalten, welche die katalytische Aktivität von Trx1 regulieren. [102] Die Cysteinreste 62 und 69 bilden unter oxidativem Stress Disulfidbrücken aus. [114]

Die TrxR katalysiert die Reduktion von Trx unter NADPH Verbrauch. Reduziertes Trx dient als Elektronenquelle für zelluläre Prozesse. Der genaue Elektronentransfer ist in Abb. 18 dargestellt:

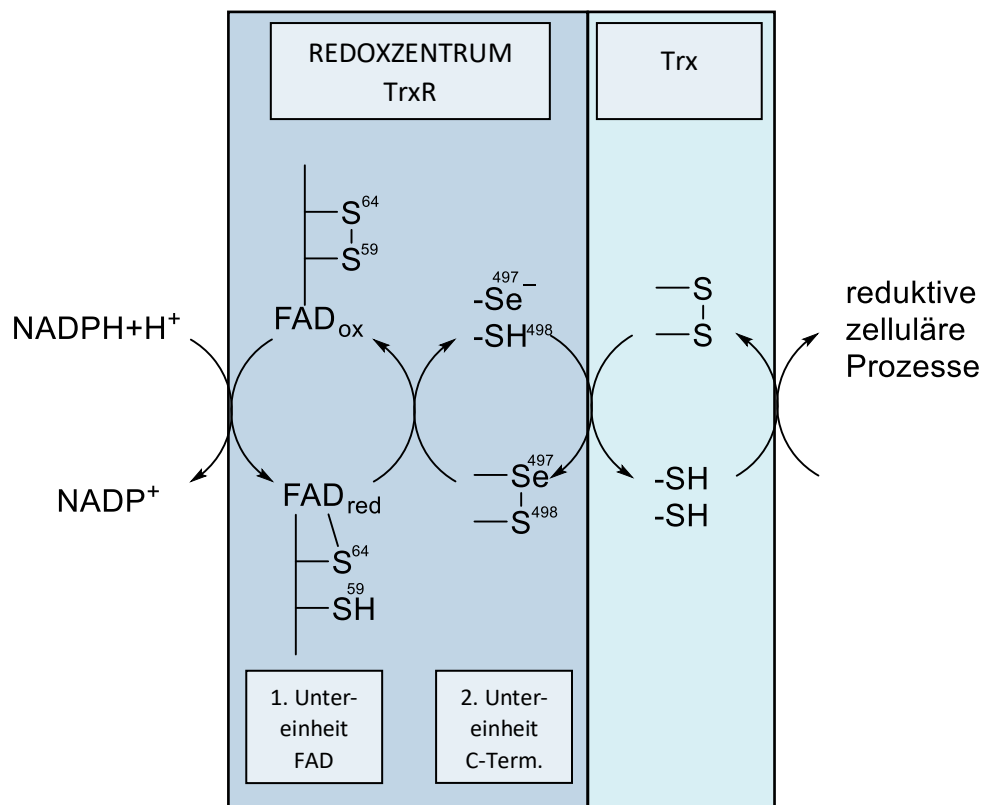


Abb. 18: Die Elektronenübertragung der enzymatischen Reaktion der TrxR auf Trx (C-Term. = C-Terminus).

Dabei überträgt NADPH die Elektronen auf die TrxR, über die FAD-Bindungsdomäne und die redoxaktiven Dithiole (Cys⁵⁹ und Cys⁶⁴) im Redoxzentrum der ersten Untereinheit. Die Elektronen werden an das Redoxzentrum des C-Terminus transportiert, wodurch Sulfhydryl und Selenol (-SeH)-Reste in der zweiten Untereinheit produziert werden. [110] Das Selenol liegt deprotoniert vor. Als starkes Nukleophil reagiert es mit den Disulfidbrücken des Trx. [110] Die Elektronen werden übertragen und durch einen Angriff von Cys⁴⁹⁷ des TrxR wird das Selenosulfid im aktiven Zentrum wieder regeneriert. [113] Durch die Übertragung der Elektronen auf weitere Zielstrukturen, werden

die Disulfidbrücken des Trx wieder ausgebaut. Eine wichtige Funktion ist die Reduktion der Ribonucleotide zu Desoxyribonucleotide für die DNA-Synthese. [108] Zudem hält es die Zelle im vorwiegend reduzierten Zustand, da jede Oxidation einer kritischen Thiolfunktion eines Biomoleküls dessen biologische Funktion ändern kann. [109]

Da das aktive Zentrum der Säugetier-TrxR eine weite Substratspezifität aufweist, fungiert nicht nur Trx als Substrat. Auch der N-Terminus besitzt eine reduzierende Wirkung, allerdings mit geringerer Aktivität als das aktive Zentrum. [112] Damit kann die TrxR nicht nur Disulfidbrücken spalten, sondern auch zahlreiche weitere Stoffe wie u.a. H_2O_2 , Glutaredoxin, Ubichinon, Vitamin K und Liponsäure, aber nicht Glutathiondisulfide reduzieren. [112,113] Allgemein lässt sich festhalten, dass der N-Terminus der TrxR in der Lage ist, Bindungen des Typs S-Y zu reduzieren, wobei es sich bei Y um eine gute Abgangsgruppe handelt. Dabei ist eine elektrophile Verstärkung notwendig, welcher im C-Terminus mit dem Selenocystein realisiert ist. [112]

Auch in den meisten Bakterienzellen ist sowohl ein Glutathion- als auch ein Thioredoxinsystem zum Schutz vor oxidativen Stress enthalten. [115] Allerdings unterscheidet sich der Aufbau der prokaryotischen TrxR von der der TrxR in Eukaryoten. Mit 70 kDa ist das Flavoprotein, welches als Dimer vorliegt, deutlich kleiner. [115] Die prokaryotische TrxR zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus. [112]

Der größte Unterschied zwischen der prokaryotischen und eukaryotischen TrxR stellt die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum dar. In der prokaryotischen TrxR findet sich nur ein aktives Zentrum mit der Sequenz: Cys-Gly-Pro-Cys- (siehe Abb. 17). [109] Das redoxaktive Zentrum wird aus Cys¹³⁵ und Cys¹³⁸ gebildet, wobei das Thiolat in Cys¹³⁸ von dem Trx attackiert wird. [114]

1.4.2.1 Das Trx-System in Säugetierzellen als Target

Die TrxR ist in Tumorzellen häufig überexprimiert. [106] Das Trx-System ist in Tumorzellen oft in der Ausbildung von Arzneistoff-Resistenzen und bei der Bekämpfung des oxidativen Stresses involviert, um malignes Wachstum weiterhin zu fördern. [102] Durch Senkung des H_2O_2 -Spiegels wird die Apoptose unterbunden. Damit sind Tumorzellen grundsätzlich abhängiger vom Trx-System als normale Zellen. [102] Reduziertes Trx ist in der Lage die ASK1 zu binden und damit die Apoptose zu verhindern. [102] Die Apoptosekaskade über den MAPK-Signalweg wird über den ASK1-Spiegel gesteuert (siehe Abb. 16). Das Trx1 kann einen inhibitorischen Komplex mit der ASK-1 bilden und damit die Apoptose verhindern, wenn sie in ihrer reduzierten Form vorliegt. [102,109] Dies ist die dominierende Form in der Zelle, wenn der oxidative Stress gering ist. [109] Steigt die Bildung der ROS an, bildet die Trx ihre oxidierte Form aus und die Apoptose wird eingeleitet. [109] Der gleiche Mechanismus wird erreicht,

wenn die TrxR inhibiert wird, da sie dann zur Reduktion von Trx nicht mehr zur Verfügung steht. Außerdem wird unter oxidativem Stress die Trx1 vom Cytosol in den Nukleus übertragen und im reduzierten Status kann Trx1 die DNA Bindungsaktivität von NFκB, einem antiapoptotischen Protein, fördern. [109]

Da das Selenocystein bei physiologischen pH-Wert deprotoniert vorliegt, fungiert es als weiche Base, welche nach dem HSAB-Konzept nach Pearson leicht mit weichen Säuren reagiert, wie Metalle der Übergangsmetalle in niedrigen Oxidationsstufen sie darstellen. [102] Durch Inhibition der TrxR steigt der ROS-Spiegel, Trx bleibt im oxidierten Zustand und über verschiedene Mechanismen wird die Apoptose eingeleitet (siehe Abb. 19). [109] Damit bietet die TrxR in Säugetierzellen für metallorganische Komplexe ein ideales Target in der Krebstherapie.

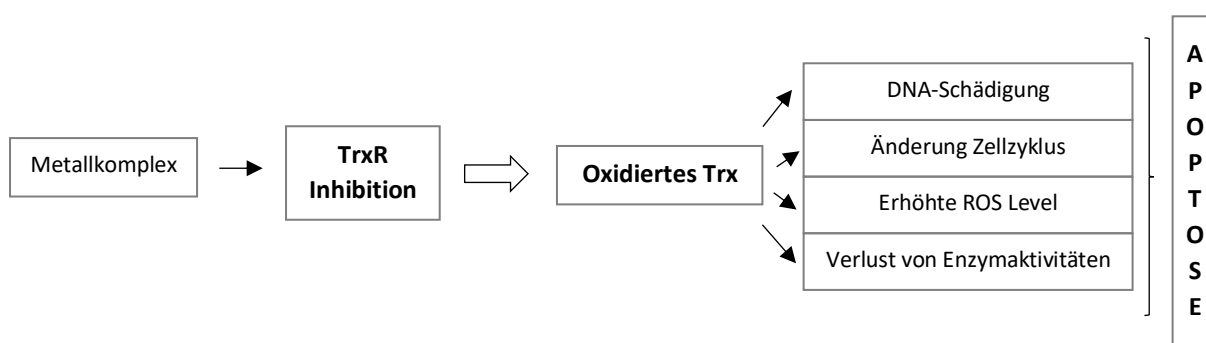


Abb. 19: Beeinflussung des Trx-Systems und mögliche Folgen durch Metallkomplexe als potenzielles Target in der Krebstherapie.

1.4.2.2 Das Trx-System in Bakterienzellen als Target

Das Bakterienwachstum kann nur garantiert werden, wenn DNA-Schäden repariert werden und das System vor ROS geschützt wird. Für die DNA-Synthese sind die Desoxyribonukleotide unabdingbar, welche durch die Ribonukleotid-Reduktase von Ribonukleotiden reduziert werden. Die notwendigen Elektronen dafür können durch das Trx- oder GR-System geliefert werden. So kann z.B. nur die reduzierte Trx-Form mit ihren freien SH-Gruppen mit hoher Affinität an die T7-DNA-Polymerase binden und so zur DNA-Replikation beitragen. [115]

Jedoch ist das GR-System in gram-positiven Stämmen nicht vorhanden. Diese sind auf das Trx-System angewiesen, um die Zelle vor ROS zu schützen. [115]

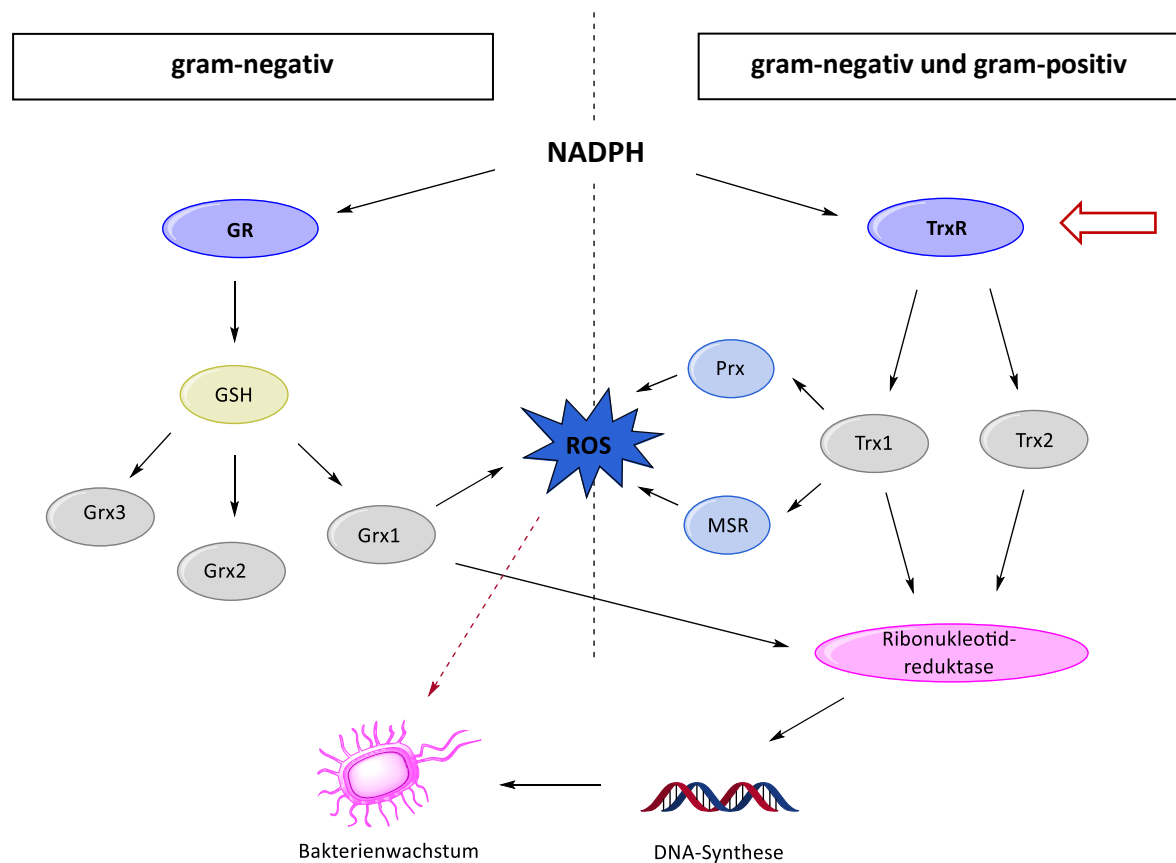


Abb. 20: Schematische Signalkaskade des Trx-Systems in gram-positiven und gram-negativen Stämmen und des GSH-Systems, welches nur in gram-negativen Stämmen vorhanden ist. [115]

Fällt das System weg, z.B. durch Inhibition der TrxR (siehe Abb. 20, roter Pfeil), ist der Schaden in der Zelle groß und das Bakterienwachstum durch fehlende DNA-Synthese bleibt aus. Damit bietet die prokaryotische TrxR ein interessantes Target für Antibiotika.

1.4.3 Die Rolle des Transferrins im Eisenstoffwechsel und als Target in der Krebstherapie

Eisen ist für den menschlichen Organismus für die DNA-Synthese, den Elektronentransport und vor allem den Sauerstofftransport essenziell. [116] Als Bestandteil des Hämoglobins in den Erythrozyten, trägt Eisen zur Bindung des Sauerstoffs bei, welcher über das Blut im gesamten Körper verteilt wird. [117,118] Damit führt ein zu niedriger Eisenspiegel zur Anämie, ein zu hoher kann Siderosen (Eisenspeicherkrankheit) führen und zur Bildung von ROS. [116]

Die Eisen-Ionen erreichen das Plasma entweder über recycelte Makrophagen oder über die Nahrungsaufnahme. Makrophagen können verbrauchte Erythrozyten verdauen, wodurch das Eisen aus dem Hämoglobin mittels der Hämoxygenase 1 wieder freigesetzt wird. [117] Über die Nahrung werden täglich ca. 10 - 12 mg aufgenommen, wovon 10 - 15 % im Dünndarm resorbiert werden. [88]

Dort liegt ein pH-Wert von 5 - 7 vor, wodurch Eisen(III)-Ionen als Hydroxid ausfallen würden. [88,116] Deshalb wird Eisen pharmakologisch als zweiwertiges Ion genutzt und auch in dieser Oxidationsstufe resorbiert. [116] Da Eisen im Blut nicht löslich ist, liegt es chelatisiert an andere Moleküle vor, womit es keine schädliche Wirkung entfalten kann und die Bildung von ROS unterbunden wird. [116,118] Eisen(II)-Ionen werden im Körper durch verschiedene Moleküle, z.B. Ascorbinsäure, im reduzierten Status gehalten. [116]

Die Eisen(III)-Ionen werden durch die Eisenreduktase Dcytb in zweiwertiges Eisen überführt, da jedes Eisen-Ion die Zellemembranen nur in der zweiwertigen Form passieren kann. [118] Die Aufnahme in die Enterozyten im Dünndarm folgt über den divalenten Metalltransporter DMT1 (siehe Abb. 21). [88,117]

Die basolaterale Abgabe der Eisenionen von den Enterozyten ins Blut folgt über den Effluxtransporter Ferroportin. [117] Die Abgabe ist den menschlichen Bedürfnissen angepasst. Es wird nur so viel Eisen aufgenommen, wie der Organismus benötigt. [88] Der Rest wird in Mukosazellen als mukosales Ferritin gespeichert. [88] Die Bildung des Ferroportins wird durch den vorliegenden Eisenspiegel und Hypoxie reguliert. [117] Eine verstärkte Expression tritt bei Eisendefizit und Anämie auf. [117] Wenn eine Hypoxie vorliegt, wird der Hypoxie-induzierte Faktor in den Enterozyten aktiviert, wodurch die Expression von DMT1 und DcytB gesteigert wird. [117]

Im Blut findet die Oxidation der Fe(II)- zu Fe(III)-Ionen durch Ceruloplasmin (einer Ferrooxidase) statt, wodurch die Bindung von zwei Molekülen Fe(III)-Ionen an Apotransferrin und damit die Bildung von Transferrin gewährleistet wird. [118,119]

Dies ist in der Lage an den Transferrinrezeptor-1 (TFR) zu binden, welcher sich auf der Oberfläche von Zellmembranen befindet. Über Endozytose gelangt der TF-Rezeptor-TF-Komplex in die Zelle. Innerhalb der Endosomen herrscht ein saurer pH-Wert, wodurch die Eisen(III)-Ionen vom TF-Rezeptor-TF-Komplex abdiffundieren können und der Rezeptor-TF-Komplex zurück an die Plasmamembran gelangt. [119]

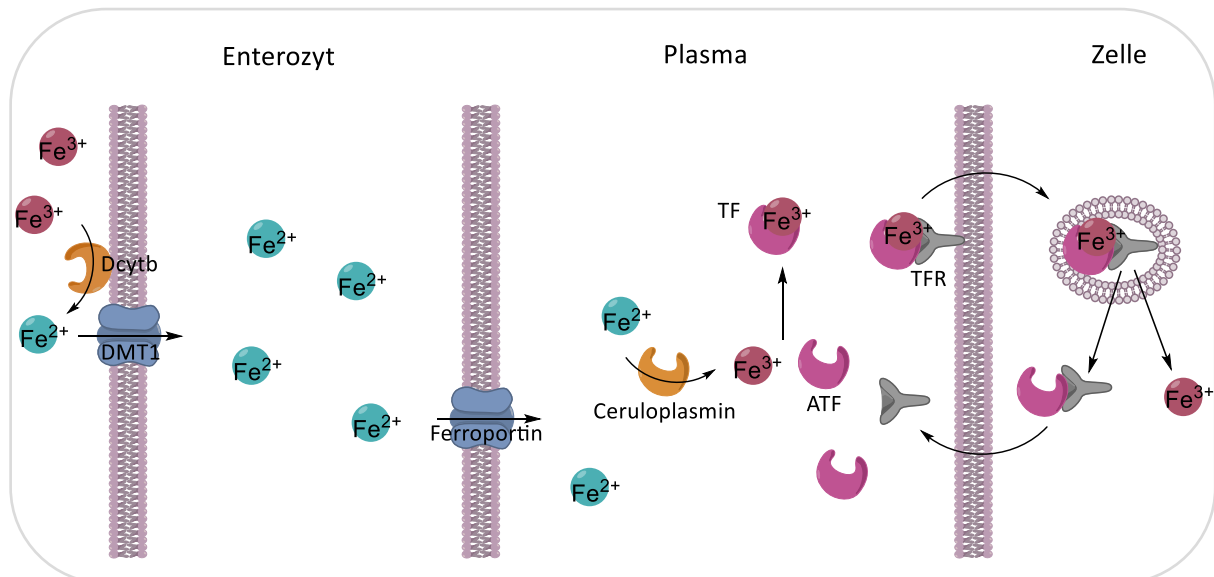


Abb. 21: Der Eisentransport von den Enterozyten über das Plasma bis hin zu den gewünschten Zielzellen.

Intraendosomales Eisen wird über STEAP3 (eine endosomale Reduktase) reduziert, die Fe(II) -Ionen passieren durch den DMT1-Transporter die endosomalen Membranen und stehen für den zellulären Metabolismus zur Verfügung. [118,119] In die Mitochondrien gelangt das Eisen über die Transporter Mitoferrin1 und Mitoferrin2. [119] Ferroportin-1 dient als Effluxtransporter, wodurch Fe(II) -Ionen zurück ins Plasma gelangen und nach Oxidation erneut, an Apotransferrin gebunden, transportiert werden können. [119]

Zwei Eisenatome liegen gebunden an ein Transferrinmolekül vor, wenn eine Plasma-Eisenkonzentration $< 45 \%$ vorliegt. Bei einer höheren Konzentration wird das nicht an Transferrin gebundene Eisen als NTBI-Eisen (NTBI=non transferrin bound iron) über die Hepatozyten aufgenommen und gespeichert. [118]

Wenn der Eisenspiegel eine Konzentration von über 75% erreicht, bildet sich LPI-Eisen (LPI=labile plasma iron) oder reaktives Plasma-Eisen aus, welches in der Lage ist, über die Fenton-Reaktion ROS zu bilden. [118]

Transferrin gehört zu der Familie der eisenbindenden Enzyme. Neben dem humanen Apotransferrin, existiert Lactoferrin in Leukozyten, Ovotransferrin im Eiweiß von Eiern, und Melanotransferrin, ein membrangebundenes Protein, welches im geringen Ausmaß auf den Oberflächen von Zellen zu finden ist. [120]

Apotransferrin ist ein monomerisches Glykoprotein und wird vorrangig in den Hepatozyten der Leber gebildet. [121] Das humane Apotransferrin besteht aus einer Polypeptidkette aus 679 Aminosäuren und zwei *N*-glykosilierten Seitenketten, wodurch sich insgesamt ein Molekulargewicht von 79570 Da

ergibt. [121] Es besteht aus zwei homologen Domänen: die N-terminale von AS 1-336 und die C-terminale von 337-679. [121] Jede Domäne besitzt eine Metallbindungsseite spezifisch für Eisen(III)-Ionen. [121] Jede Bindungsseite enthält zwei Tyrosin, ein Histidin, ein Asparagin und ein zweizähniges Carbonat-Ion, welches synergistisch als Anion im Bindungsprozess fungiert. [122]

Krebszelllinien besitzen aufgrund ihres schnelleren Wachstums einen erhöhten Bedarf an Sauerstoff und damit auch an Eisen. Um diese Aufnahme zu garantieren, ist der Transferrin-Rezeptor in Krebszellen überexprimiert und die Dichte an Rezeptoren auf der Oberfläche von Krebszellen stark erhöht. [123] Der Spiegel des Transferrinrezeptors geht mit dem Eisenbedarf und auch der Zellproliferation einher. [123] Damit stellt dieser Stoffwechselweg ein interessantes Ziel im Drug Targeting dar. Eine Möglichkeit ist die direkte Inhibition des Transferrinrezeptors, um die Aufnahme von Eisen in die Krebszellen zu unterbinden, welche bereits durch monoklonale Antikörper untersucht wurde. [124] Die andere Möglichkeit ist, durch gezielte Bindung des Wirkstoffes an Transferrin, die Anreicherung in den malignen Zellen zu erhöhen. [124] Diese Wirkungsweise wird in der organometallischen Forschung kontrovers diskutiert.

Für die Rutheniumkomplexe KP1019 und NAMI-A (siehe Kapitel 1.2.1) wurde bereits die Bindung an humanes Apotransferrin *in vitro* nachgewiesen. Kristallstrukturen zeigten die Bindung von KP1019 an humanes Lactoferrin. [120] MS-ESI Studien mit KP1019 an humanes Serumtransferrin bestätigten die Ergebnisse. [122] *In vivo* Studien mit KP1019 zeigten aber bereits, dass die Ruthenium-TF-Addukte in so geringen Mengen gebildet werden, dass diese nach Injektion des Komplexes in den Menschen nicht mehr quantifiziert werden konnten. [50] Die vorrangige Proteinbindung im Plasma ist die an Albumin über hydrophobe Bindungsdomänen des Albumins, welche bei Apotransferrin nicht vorhanden sind. [50] Auch die Eisensättigung während dieses Mechanismus wurde untersucht. So wurde KP1019 unter Eisen- und Apotransferrin-Zugabe getestet, wodurch eine gesteigerte Zytotoxizität verzeichnet wurde. [50]

Dennoch gibt es bisher keine Evidenz, dass der Rutheniumkomplex an Transferrin gebunden bevorzugt in Krebszelllinien aufgenommen wird. [50]

2. Strukturentwicklung und Zielsetzung der Arbeit

Bereits vor dieser Arbeit wurden verschiedene NHC-Metallkomplexe synthetisiert und biologisch evaluiert. Diese Metallkomplexe beinhalten Metallatome vorrangig aus der ersten Nebengruppe (Kupfer(II), Silber(I), Gold(I)), sowie der achten Nebengruppe (Ruthenium(II), Rhodium(I)) des Periodensystems. [125–128] Als Liganden fungierten strukturelle Modifikationen von Imidazol-, Benzimidazol oder Phenylimidazol-Grundkörpern. Die Stickstoffe wurden mit Methyl-, Ethyl-, Isopropyl- oder auch Benzylgruppen substituiert. Nach und nach wurde die biologische Evaluierung mit zahlreichen Methoden auf unterschiedliche Zielstrukturen ausgedehnt und Erfahrungen hinsichtlich der Stabilität der Komplexe und ihrer Wirkmechanismen gewonnen. So lässt sich bereits festhalten, dass vor allem Gold(I)-Komplexe eine starke Interaktion mit der TrxR eingehen, die sowohl in Säugetierzellen als auch in Bakterien auftritt und somit nicht nur als potenzielle Zytostatika, sondern auch als Antibiotika interessante Verbindungen darstellen. [128,129] Die Rhodium(I)-Komplexe zeigen vielversprechende antiproliferative Eigenschaften an verschiedenen Krebszelllinien und Interaktionen in Apoptose-Signalwegen. [125] Ruthenium(II)-NHC-Komplexe zeichnen sich durch gute Proteinbindungseigenschaften aus und erwecken ein immer größer werdendes Interesse in der Krebsforschung. [126]

Vor allem seit die Komplexe NAMI-A und KP1019 das Stadium klinischer Studien erreicht haben, besteht ein besonderes Interesse an der Entwicklung Ruthenium-haltiger Strukturen. [50] Bei diesen Substanzen handelt es sich um Ruthenium(III)-Komplexe. Es wird vermutet, dass diese im Körper durch den „activation by reduction“-Mechanismus zunächst zu Rutheniumderivaten mit der Oxidationsstufe +II umgewandelt werden. [48,130,131]

Deshalb war es folgerichtig, direkt Rutheniumkomplexe mit der Oxidationsstufe +II zu entwickeln, wobei man auf verschiedene Ansätze gestoßen ist, diese Oxidationsstufe zu stabilisieren. [30] Eine gute Möglichkeit stellt das Aren-Fragment dar, welches durch seine Eigenschaften als σ -, π -Donator einerseits und π -Akzeptor andererseits ideale chemische Eigenschaften in sich vereinigt. [30] Vorreiter dieser Molekülgruppe stellen die von Dyson et al. entwickelten RAPTA-C Komplexe dar. [132,133]

Auf der anderen Seite sind NHC-Liganden starke σ -Donatoren, die aber auch eine starke d - π^* -Rückbindung vom Metallion aufweisen, wie auch umgekehrt als π -Donatoren zu den d-Orbitalen des Metallions fungieren können. [30,134] Gute Erfahrungen mit den NHC-Liganden wurden bereits bei zahlreichen Goldkomplexen, wie bei den NHC-Goldchloriden, gemacht. [128] Mit dem Liganden wird eine starke Carben-Metallbindung ausgebildet, die den Komplex und damit auch die Oxidationsstufe +II stabilisiert. Der Zusammenschluss von NHC-Ligand einerseits und Ruthenium als Metallion in

der Oxidationsstufe +II andererseits bildet die Grundlage der neu synthetisierten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe (siehe Abb. 22).

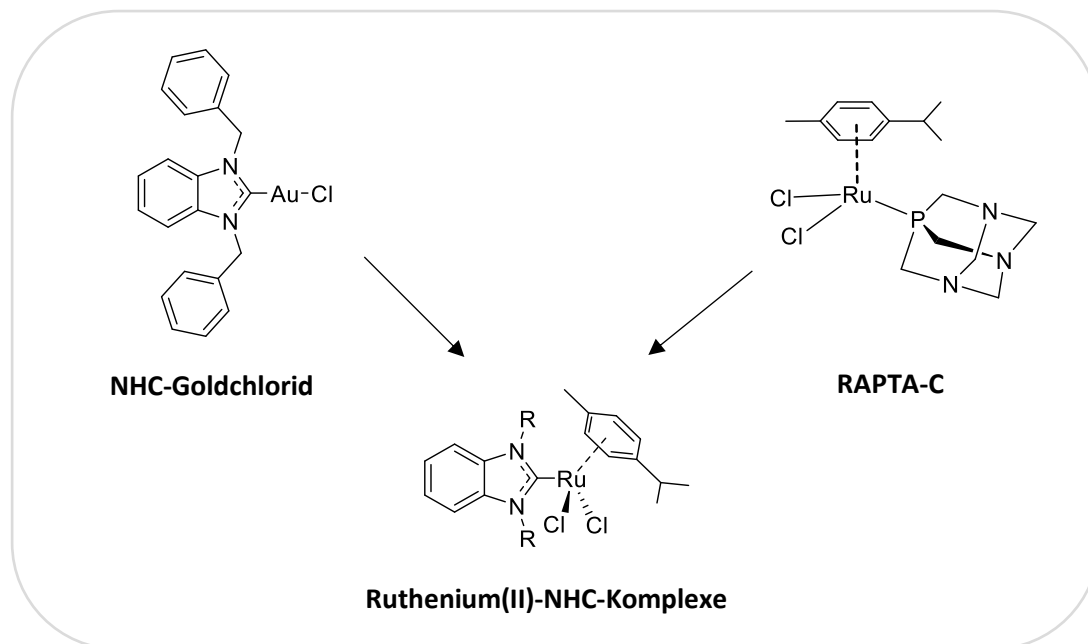


Abb. 22: Strukturentwicklung der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe aus den NHC-Goldchloriden und RAPTA-C. [128,132]

Die bisher synthetisierten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe basieren auf einem Benzimidazolgrundkörper, der an den Stickstoffen unterschiedlich substituiert ist: Methyl-, Ethyl-, Isopropyl- und Benzylgruppen. Bei der bioanalytischen Evaluierung zeigte sich, dass der benzylierte Komplex im Vergleich zu den anderen Komplexen die aktivste Substanz darstellte. Er wurde am stärksten in die Zelle aufgenommen, wodurch die stärksten antiproliferativen Eigenschaften mit IC_{50} -Werten im unteren mikromolaren Bereich erzielt wurden. Die Komplexe mit anderer Seitenkette blieben dagegen inaktiv mit IC_{50} -Werten $> 100 \mu M$. [126]

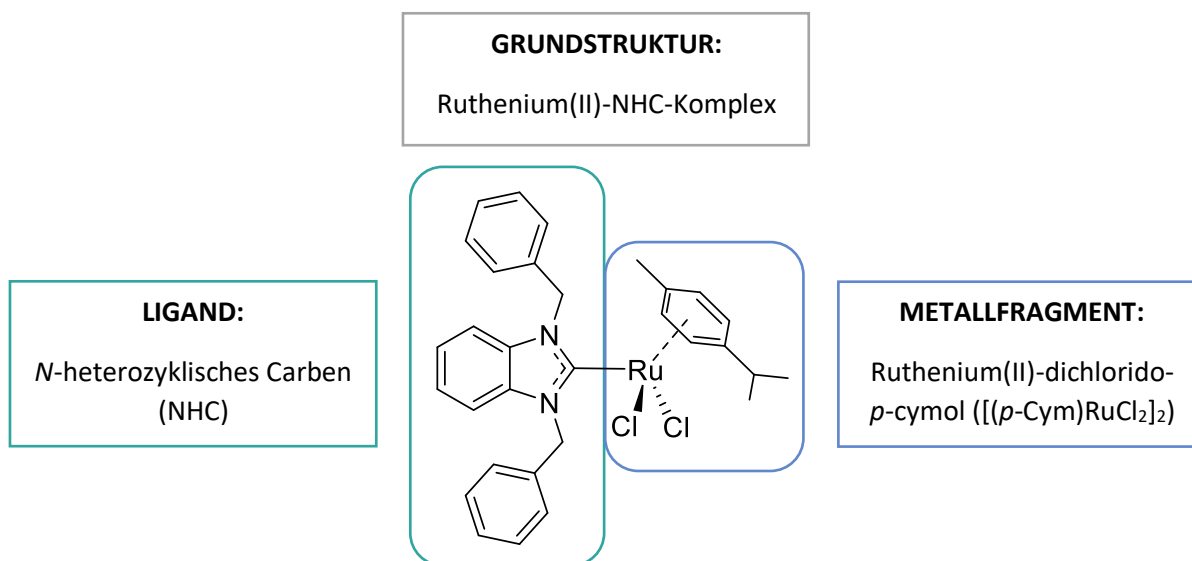


Abb. 23: Schematische Darstellung des Aufbaus der neuen Ruthenium(II)-NHC-Komplexe.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand nun darin, diese Leitstruktur unter Erhalt der lipophilen Seitenketten zu modifizieren und die neu synthetisierten Derivate mit verschiedenen bioanalytischen Testverfahren auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchen.

Die Arbeit baut auf vier strukturellen Modifikationen der Leitstruktur auf (siehe Kapitel 2.1), wobei sowohl der NHC-Ligand (Modifikationen 1 und 2) als auch das Rutheniumfragment (Modifikationen 3 und 4) verändert wurden. Unverändert bleibt in allen Komplexen der *p*-Cymol-Rest als Aren-Fragment.

1. Substitution der 5-Position am Benzimidazol
 - Einführung von Donator- und Akzeptorgruppen in das Molekül
2. Verkleinerung des Grundkörpers zum Imidazol
 - Erhaltung der Seitenketten und Bromierung der 4-Position
 - Vergrößerung der Seitenketten zu Mesitylengruppen
3. Austausch der Chlorido-Liganden am Rutheniumfragment gegen andere Halogenide
 - In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Hartinger der University of Auckland in Neuseeland wurde der Einfluss der Chlorido-Liganden am Ruthenium-Aren-Fragment untersucht, indem diese gegen Bromido- und Iodido-Liganden ausgetauscht wurden.
4. Austausch der Chlorido-Liganden am Rutheniumfragment gegen Pyrrithion
 - In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Iztok Turel der University of Ljubljana in Slowenien wurden die Chlorsubstituenten gegen Pyrrithion ausgetauscht.

Alle Modifikationen wurden im Hinblick darauf geplant, mit Hilfe geeigneter bioanalytischer Methoden Veränderungen in der biologischen Wirksamkeit gegenüber der Leitstruktur aufzudecken.

Ein großes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf den Strukturmodifikationen in der 5-Position der Benzimidazole, weshalb mit diesen Strukturen die meisten Testungen durchgeführt wurden.

Analysiert wurden die Substanzen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung bei zwei großen Indikationsgebieten: zum einen sollte ihre Wirksamkeit als potentielle Zytostatika, zum anderen als potentielle Antibiotika geprüft werden.

Bei der Evaluation auf zytostatische Wirksamkeit, wurde der Einfluss der Substanzen auf Zellebene untersucht. Hierbei wurde sowohl die Veränderung der Zellviabilität mittels Kristallviolettassay getestet als auch die Konfluenz der Zellen unter Substanzeinfluss mittels Videomikroskopanalyse. Dabei war es zudem möglich, die morphologischen Änderungen der Zellen zu beurteilen. Das Apoptoseverhalten einiger Substanzen wurde in Kooperation mit Dr. Dr. Aram Prokop, Leiter der

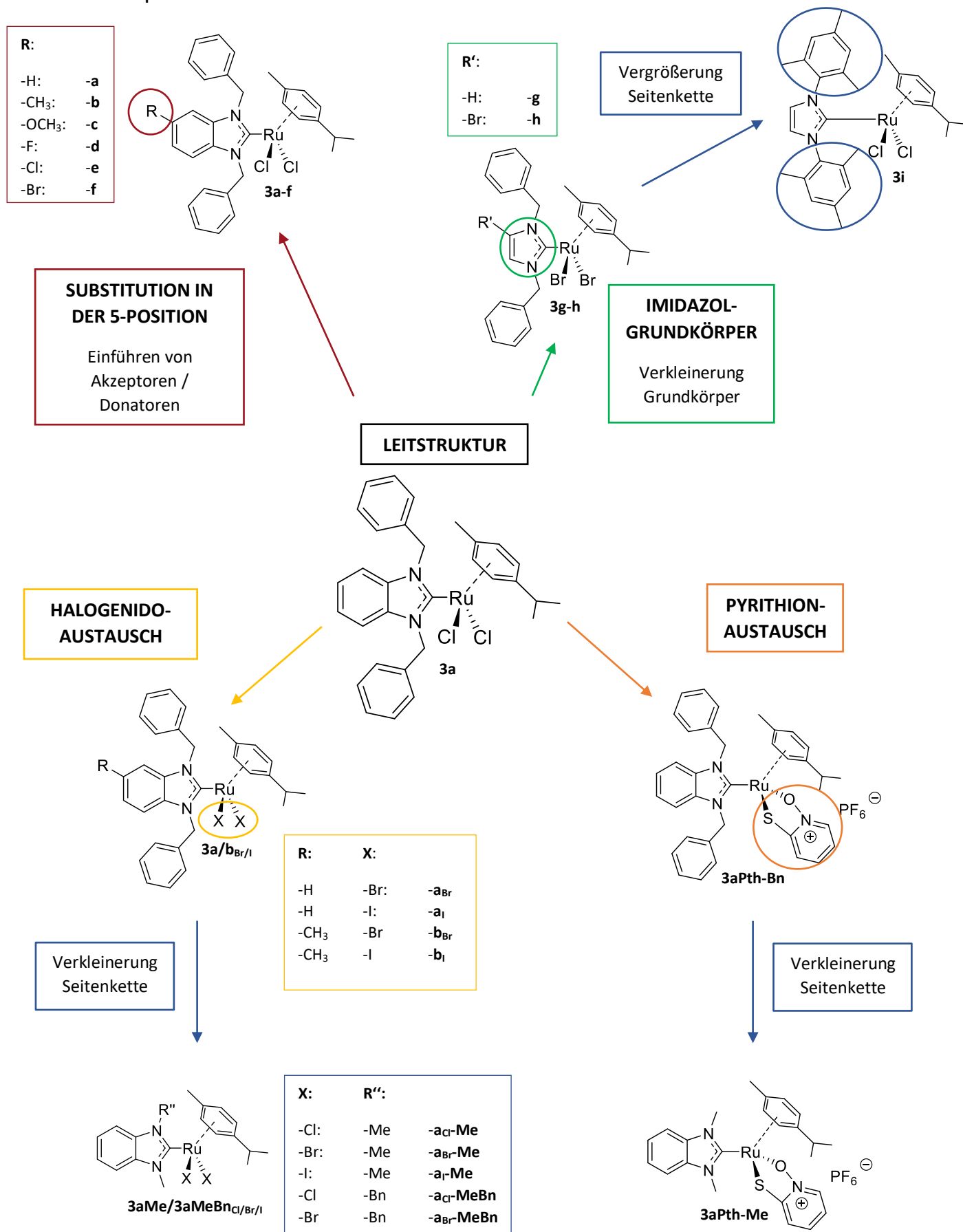
Onkologie des Kinderkrankenhauses in Köln, untersucht. Hierbei konnte nicht nur Apoptoseinduzierung festgestellt werden, sondern auch der Apoptosemechanismus wurde genauer erforscht. Da auch die TrxR ein mögliches Target darstellt, bot die Prüfung ihrer Inhibition durch die Substanzen eine weitere Möglichkeit, um den Wirkmechanismus der Komplexe auf Zellebene genauer zu untersuchen.

Transferrin wird schon länger als mögliches Transportprotein für Rutheniumkomplexe diskutiert. [50,122,135]. Deshalb wurden Methoden zur Untersuchung der antiproliferativen Eigenschaften und Bioverteilung unter Anwesenheit von Apotransferrin etabliert. Erste Aussagen konnten über die Bioverteilung durch Zellaufnahmestudien getroffen werden. Hierbei wurde der Metallgehalt in gewonnenen Zellpellets mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Dabei wurde die An- und Abwesenheit von fetalem Kälberserum (FCS) zum Medium erforscht. Zusammen mit Proteinbindungsstudien können so fundierte Aussagen über die Bioverteilung und das Proteinbindungsverhalten getroffen werden. Nicht nur der Metallgehalt, sondern auch der Gehalt an organisch-gebundenen Fluor konnte mittels MAS (Molekülabsorptionsspektroskopie) beispielhaft für einen Komplex bestimmt werden. Zur Prüfung der antibiotischen Wirksamkeit wurden die minimale Hemmkonzentration (MIC) an verschiedenen Bakterienstämmen und die Inhibition der bakteriellen TrxR untersucht.

Während der Arbeit wurde außerdem ersichtlich, dass auch die (Benz-)Imidazoliumhalogenide, folgend bezeichnet als Liganden, selbst bei der Testung biologische Effekte zeigen. Damit erweiterte sich die Aufgabenstellung um die Klärung der Frage, welchen Einfluss der NHC-Ligand auf die biologische Wirkung hat, welche Effekte auf dem gesamten Rutheniumfragment beruhen und welche Rolle das eigentliche Metallion dabei spielt.

Zusammenfassend sollte also geklärt werden, ob sich durch gezielte Modifikationen von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen aussagekräftige Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten lassen.

2.1 Komplette Substanzübersicht und Strukturmodifikationen



3. Chemische Darstellung und Analytik neuer Ruthenium(II)-NHC-Komplexe

3.1 Strukturdesign

3.1.1 Substitution der 5-Position des Benzimidazols

Durch Einführung von Akzeptor- und Donator-Gruppen in das Molekül soll die Donor-Kapazität des Carbens variiert und damit die Stärke der Bindung zwischen NHC-Ligand und Metall systematisch verändert werden. Dies sollte sich nicht nur in der Stabilität des Komplexes bemerkbar machen, sondern auch in den biologischen Eigenschaften der Komplexe widerspiegeln. Synthetisiert wurden Liganden mit folgenden Substituenten und elektronischen Eigenschaften (siehe Tab. 1). Bei allen Testungen dient der unsubstituierte Komplex **3a**, bzw. Ligand **2a** als Vergleich.

	Substituent	Abkürzung	Elektronische Eigenschaften	
	-H	-a	- (als Vergleich)	
	-CH ₃	-b	+I-Effekt	
	-OCH ₃	-c	-I-Effekt / +M-Effekt	
	-F	-d	-I-Effekt	
	-Cl	-e	-I-Effekt	
	-Br	-f	-I-Effekt	
Zunahme Van-der-Waals-Radien				Abnahme Elektronegativität

Tab. 1: Auflistung der Substituenten und ihrer elektronischen Eigenschaften am Benzimidazol.

Halogene liefern dem Molekül, neben dem negativen induktiven Effekt, der von Fluor nach Brom abnimmt, noch weitere Effekte. Durch die Zunahme der Van-der-Waals-Radien von Fluor nach Brom, wird das Molekül vergrößert und damit die Lipophilie erhöht. Halogene besitzen einen hohen Stellenwert in der Arzneistoffentwicklung. [136] Die Wechselwirkung mit möglichen Zielstrukturen kann bei Anwesenheit von Halogenen durch Halogenbindung, schwache Wasserstoffbrückenbindungen oder auch aromatische Interaktionen erfolgen. Vor allem durch Halogenbindungen können die Interaktionen stark variieren. Dies kann zu Konformationsänderungen von Proteinen führen. [137] Darüber hinaus wurde mit dem Fluorsubstituenten eine Komponente geschaffen, die sich mit Hilfe einer AAS-Methode detektieren lässt. Damit können Rückschlüsse auf den gesamten Ruthenium-Komplex und den Liganden während Zellaufnahme geschlossen werden.

3.1.2 Verkleinerung des Imidazolgrundkörpers

Da bereits die Verkleinerung des Grundkörpers vom Benzimidazol zum Imidazol an Gold(I)-NHC-Komplexen erfolgreich untersucht werden konnte, wurde diese Modifikation auch auf die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe übertragen. [138] Für das Strukturdesign wurde nicht nur das 1*H*-Imidazol verwendet, sondern in Anlehnung an Kapitel 3.1.1 auch die Substitution in 4-Position des Imidazols untersucht. Hierbei sollte neben dem 4-Brom- ursprünglich auch das 4-Methyl-Derivat hergestellt werden. Als Startmaterial für die entsprechende Synthese wird jedoch 4-Methylimidazol benötigt. Dieses entsteht u.a. als Nebenprodukt der Maillard-Reaktion und ist damit in vielen Getränken und Nahrungsmitteln in Spuren enthalten. [139] Eine karzinogene Wirkung wird diskutiert. [139] Die Substanz ist darüber hinaus stark ätzend und reizend beim Einatmen, so dass Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre empfohlen wird. [139–141] Aus sicherheitstechnischen Bedenken wurde diese Modifikation daher nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Austausch der Chlorido-Liganden gegen andere Halogenide

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartinger der University of Auckland wurden die Chlorido-Liganden gegen andere Halogenide ausgetauscht. Die Hydrolyse der Chlorido-Liganden des Ruthenium(II)-Fragments wurde bereits untersucht. (siehe Abb. 24) Diese ist abhängig von der vorherrschenden Chlorid-Konzentration im Medium. Bei hohen Konzentrationen (100 mM NaCl-Lösung) wird sie gehemmt. Bei niedrigen Konzentrationen (4 mM NaCl-Lösung), wie sie vergleichbar intrazellulär vorliegt, wird die Hydrolyse begünstigt. [86] In Lösemitteln wie DMF bleibt der Komplex stabil. [142] Während des Hydrolyseprozesses wird zuerst ein Chlorido-Ligand gegen ein Wassermolekül ausgetauscht und der Mono-Aquakomplex ausgebildet. Im zweiten Schritt wird der zweite Chlorido-Ligand durch eine Hydroxogruppe ersetzt und der Hydroxy-Aquakomplex formiert sich. Bei physiologischen pH-Wert liegt vorrangig der Aquakomplex vor. [142]

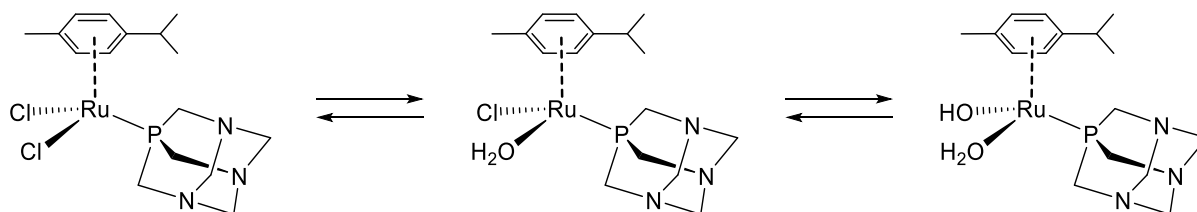


Abb. 24: Schrittweise Hydrolyse der Chlorido-Liganden des RAPTA-C Moleküls. [142]

Biologische Testungen von Oxali-RAPTA und Carbo-RAPTA, strukturell angelehnt an die Weiterentwicklungen von Cisplatin, haben bereits ergeben, dass durch Austausch der Chlorido-Liganden gegen zweizählige Liganden, die Hydrolyse und die Entstehung des Aquakomplexes unterbunden werden kann. [86] Jedoch resultierte der Ligandenaustausch in einer gleichbleibenden biologischen Wirksamkeit. [86,142] Die Hydrolyse der Chlorido-Liganden findet zwar statt, führt aber zu keiner Aktivierung des Metallkomplexes. Die Arbeitsgruppe um Sadler et al. führte biologische Evaluierungen von Azo- und Iminopyridin-Ruthenium(II)-Komplexen mit Chlorido- und Iodido-Liganden im Vergleich durch. [143] Dabei war das Iodido-Analogon der Chlorido-Variante überlegen, da es die stärkeren antiproliferativen Eigenschaften und größere Selektivität an Krebszellen zeigte. [143] Der Austausch der Chlorido-Liganden innerhalb der neu synthetisierten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe soll zeigen, ob dies zu Unterschieden im biologischen Verhalten dieser Substanzklasse führt.

Zudem wurde die Substanzreihe um Strukturen mit modifizierter Seitenkette erweitert. Nicht nur die benzylierten Rutheniumkomplexe mit Chloridoaustausch wurden synthetisiert, sondern auch zweifach methylierte, bzw. gemischt methylierte / benzylierte Komplexe sind Teil dieser Substanzserie.

3.1.4 Austausch der Chlorido-Liganden gegen Pyrrhion

Wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, unterliegen die Chlorido-Liganden einem Metabolismus. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Iztok Turel wurden die Chlorido-Liganden gegen Pyrrhion ausgetauscht. Pyrrhion weist antimykotische Eigenschaften auf und wurde schon als Bestandteil in zahlreichen Metallkomplexen untersucht. [144] So wird Zink-Pyrrhion in Antischuppenshampoos klinisch eingesetzt. [145] Ruthenium-Pyrrhion-Komplexe zeigen vielversprechende, antitumoröse Eigenschaften und eine Inhibition der Aldo-Ketoreduktase, welche an der Bildung von Hormon-abhängigen Krebsarten beteiligt ist. [146]

Das Besondere an den neu entwickelten Strukturen ist die Bildung eines positiv geladenen Komplexes mit Hexafluorophosphat (PF_6^-) als Gegenion. Durch die Ladung werden die Eigenschaften des Komplexes deutlich verändert.

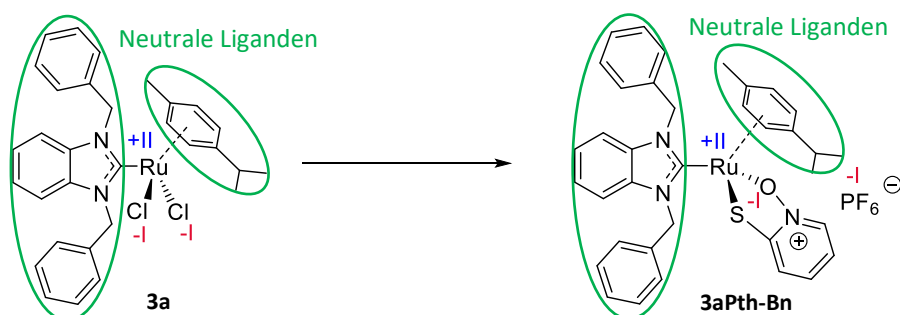


Abb. 25: Änderung der chemischen Ladung des Komplexes durch Bindung an Pyrrhion.

Normalerweise besitzen die Chlorido-Liganden jeweils die Oxidationsstufe -I, das Rutheniumatom liegt in der Oxidationsstufe +II vor und der NHC-Ligand ist neutral. Damit ergibt sich ein insgesamt neutraler Komplex. Die Ladungsneutralität wird durch die vom Pyrithion eingebrachte positive Ladung aufgehoben, obwohl sich die Oxidationsstufen der am Ruthenium gebundenen Ligandatome nicht ändern. Eine Änderung der Ladung kann sich im biologischen Verhalten bemerkbar machen. So reichern sich z.B. kationisch-lipophile Stoffe bevorzugt in Mitochondrien an, da der elektrochemische Gradient zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran die Aufnahme begünstigt. [147]

3.2 Synthese

3.2.1 Synthese des 5-Fluorbenzimidazols

Bei der Synthese der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Benzimidazoliumhalogenide konnte auf die entsprechenden, käuflich erworbenen Benzimidazole zurückgegriffen werden. Im Fall der Fluor-substituierten Komponente wurde für das benötigte Benzimidazolderivat zunächst ausgehend von 4-Fluor-1,2-phenyldiamin eine Ringschlussreaktion durchgeführt. [129] Diese konnte nach der Methode von Bastos et al. modifiziert werden. [148]

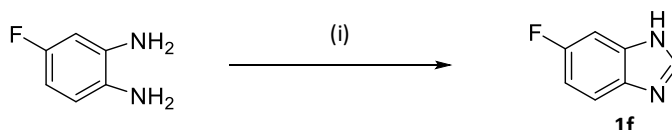


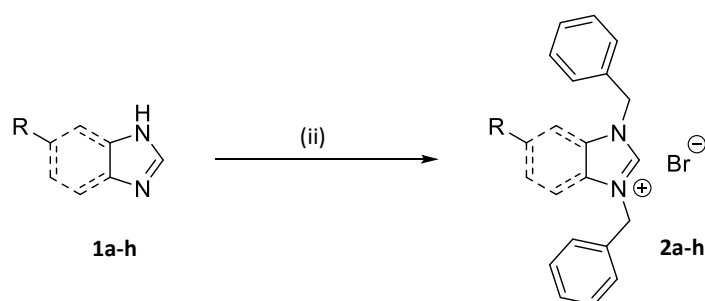
Abb. 26: Benzimidazolsynthese: (i): HCOOH, HCl, 135°C, 4h.

So wurde der Ringschluss unter Zugabe von Salzsäure säurekatalysiert durchgeführt. Nach der Reaktionszeit erfolgte das Alkalisieren der erhaltenden Lösung mit Ammoniaklösung, wobei der pH-Wert auf 8-9 eingestellt wurde. Dadurch wurde garantiert, dass das entstandene Benzimidazol als ungeladenes Molekül in Ethylacetat ausgeschüttelt werden konnte. Das ermöglichte bei gleicher Reaktionszeit von 4 h eine Ausbeutesteigerung auf 78 %.

Methode	Reagenzien (i)	Reaktionszeit [h]	pH-Wert Einstellung	Lösemittel zum Ausschütteln	Ausbeute [%]
Schmidt et al. [129]	HCOOH	4	7	DCM	47 %
Methode 2 [148]	HCOOH, HCl	24	10-12	Ethylacetat	70 %
neu	HCOOH, HCl	4	8-9	Ethylacetat	78 %

Tab. 2: Methodenoptimierung der Benzimidazol-Ringschlusssynthese.

3.2.2 Synthese neuer Dibenzyl(benz-)imidazoliumhalogenide

Abb. 27: Synthese der Dibenzylbenzimidazoliumhalogenide: (ii): 2,5 Äq K_2CO_3 , 2 Äq Benzylbromid, ACN, RT, 2-21 Tage.

Die Alkyl-(benz-)imidazoliumhalogenide wurden nach bekannten Methoden synthetisiert, die Vorschriften wurden jedoch modifiziert. [128] Anstelle von Refluxbedingungen wurde Raumtemperatur gewählt, da die Energiezufuhr keinen positiven Einfluss auf die Reaktionszeit zeigte. Zudem wurde zum Ausfällen der Produkte und Auswaschen des Benzylierungsmittels Diethylether anstelle Tetrahydrofuran verwendet. THF war im Falle der Reaktionen von **2f** und **2h** nicht in der Lage die Produkte auszufällen.

Die Reaktionszeiten unterscheiden sich stark je nach (Benz-)Imidazol-Grundkörper und Substituenten. Die Benzylierung beruht auf dem Mechanismus der nukleophilen Substitution S_N . [149,150] Die Halogensubstituenten üben einen -I-Effekt auf das aromatische System aus und setzen damit die Nukleophilie der Stickstoffe herab. Der nukleophile Angriff am Benzylbromid ist damit erschwert. Bei unsubstituierten Benzimidazolen, bzw. mit Methylgruppen substituierten Benzimidazolen tritt das Gegenteil ein und der nukleophile Angriff wird begünstigt. Dies zeigte sich auch in der Reaktionszeit und Ausbeute der entsprechenden NHC-Liganden. So wurde Ligand **2b** bereits nach 3 Tagen vollständig umgesetzt und konnte mit einer Ausbeute von 70 % gewonnen werden. Hingegen erforderte die Benzylierung zu Substanz **2f** mit 21 Tagen eine deutlich längere Reaktionszeit und lieferte lediglich eine

Ausbeute von 26 %. Eine Nitrogruppe übt einen so großen -M-Effekt auf das aromatische System aus und erschwert den nukleophilen Angriff so sehr, dass Nitrobenzimidazol unter den dargestellten Reaktionsbedingungen nicht vollständig benzyliert werden konnte.

3.2.3 Synthese neuer Ruthenium(II)-NHC-Komplexe

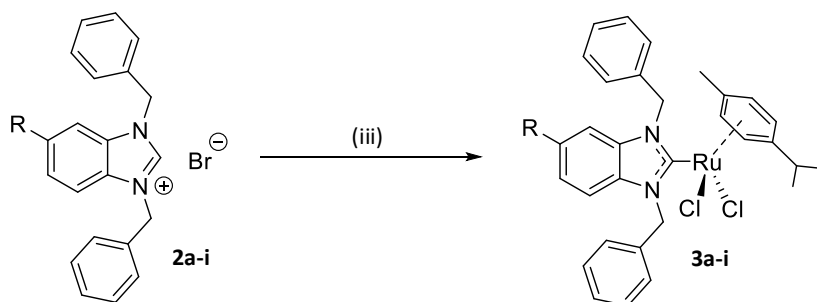


Abb. 28: Synthese der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe: (iii): 0.6 Äq Ag_2O , 0.55 Äq $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$, DCM, RT, 2-30 Tage.

Die Synthese der Rutheniumkomplexe beruhen auf bereits bekannten Transmetallierungsreaktionen. [126] Durch Zugabe von Silberoxid (Metallierung) und anschließender Umsetzung mit $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ (Transmetallierung) konnten die Metallkomplexe hergestellt werden. Probleme traten bei der Wahl der idealen Reaktionszeit und der Aufreinigung auf. So wurden verschiedene Reaktionszeiten und unterschiedliche Äquivalentverhältnisse zwischen Silberoxid und Ruthenium-Dimer in der Durchführung der Synthese genutzt. In Tab. 3 sind die optimierten Bedingungen für die Synthese von Komplex **3a** dargestellt. Die Ausbeute konnte von 35 % auf 63 % fast verdoppelt werden.

Substanz	Äquivalente Ag_2O	Reaktionszeit Metallierung [h]	Reaktionszeit Transmetallierung [h]	Ausbeute [%]
3a (alt) nach [126]	0,5	4 h	3-8	35
3a (neu)	0,6	12 h	48	63

Tab. 3: Alte Reaktionsbedingungen (**3a (alt)**) und deren Optimierung (**3a (neu)**) für die Synthese von **3a**.

Auch bei den halogenierten Komplexen **3d-f** und Komplexen mit sperrigen Resten **3i** musste die Reaktionszeit erhöht werden. Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigte eine Reaktionsdauer von mehreren Tagen an, wobei nur Komplex **3d** vollständig zum gewünschten Produkt umgesetzt wurde. Im Fall von Komplex **3i** bildete sich dieser auch nach 21 Tagen Reaktionszeit nur in

geringen Mengen aus. Um zu einem reinen Produkt zu kommen, musste hier die Aufreinigung geändert werden. Das geänderte Verfahren wurde dann auch für die Komplexe **3e** und **3f** herangezogen. Die bisher verwendete Aufreinigung durch Filtration über Celite® und anschließende Auskristallisation lieferte ein Gemisch aus gewünschtem Produkt und einem geringen Anteil an Ruthenium-Dimer-Edukt. [126] Als geeignet stellte sich letztendlich eine säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel mit einem Elutionsmittel von 5 % MeOH in DCM heraus. Diese Methode ging zwar deutlich auf Kosten der Ausbeute (Bsp. **3f** mit 16 %), aber nur so ließen sich reine Endstufen erhalten. Die schlechte Zugänglichkeit von **3i** stellt auch den Grund dar, weshalb dieser Komplex nur im Zellviabilitätstest (siehe Kapitel 4.1.3) getestet werden konnte und keine anderen biologischen Daten in dieser Arbeit diskutiert werden. Der Komplex konnte nur in geringen Mengen rein erhalten werden.

3.2.4 Synthese neuer Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden

Ein Teilprojekt dieser Arbeit stellt der Halogenaustausch der Chlorido-Substituenten an dem Rutheniumfragment gegen Bromido- und Iodido-Substituenten dar. Ausgegangen wurde bei der Reaktion von den entsprechenden Benzimidazoliumbromiden, die über die Transmetallierungsreaktion mit dem entsprechenden halogenierten Ruthenium-Dimer ($[(p\text{-Cym})\text{RuBr}_2]_2$ oder $[(p\text{-Cym})\text{RuI}_2]_2$) umgesetzt wurden. Nach der Aufreinigung zeigte die Elementaranalyse Ergebnisse für ein anscheinend reines Produkt (Abweichung des gemessenen Wertes in der Elementaranalyse < 0,5 % im Vergleich zum berechneten Wert). Zur Absicherung der Struktur wurde ein hochaufgelöstes Massenspektrum im positiven ESI-Modus der Substanz aufgenommen (siehe Abb. 29). Die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe zeigen im positiven ESI-Modus immer gleichartige Fragmentierungsmuster: Charakteristisch sind zwei Fragmente, die durch einfache Abspaltung $[\text{M-X}]^+$ oder zweifache Abspaltung $[\text{M-2X}]^+$ der Halogenidliganden am Ruthenium ($\text{X} = \text{Halogen}$) entstehen. Darüber hinaus kann der *p*-Cymol-Rest abgespalten werden $[\text{M-X-}p\text{-Cym}]^+$ und zusätzlich auch das Rutheniumatom, wodurch dann der NHC-Ligand vorliegt $[\text{M-X-}p\text{-Cym-Ru-H}]^+$. Dennoch ergab sich im Massenspektrum ein Fragment, das zunächst nicht erklärt werden konnte (grüne Markierung, Abb. 29)

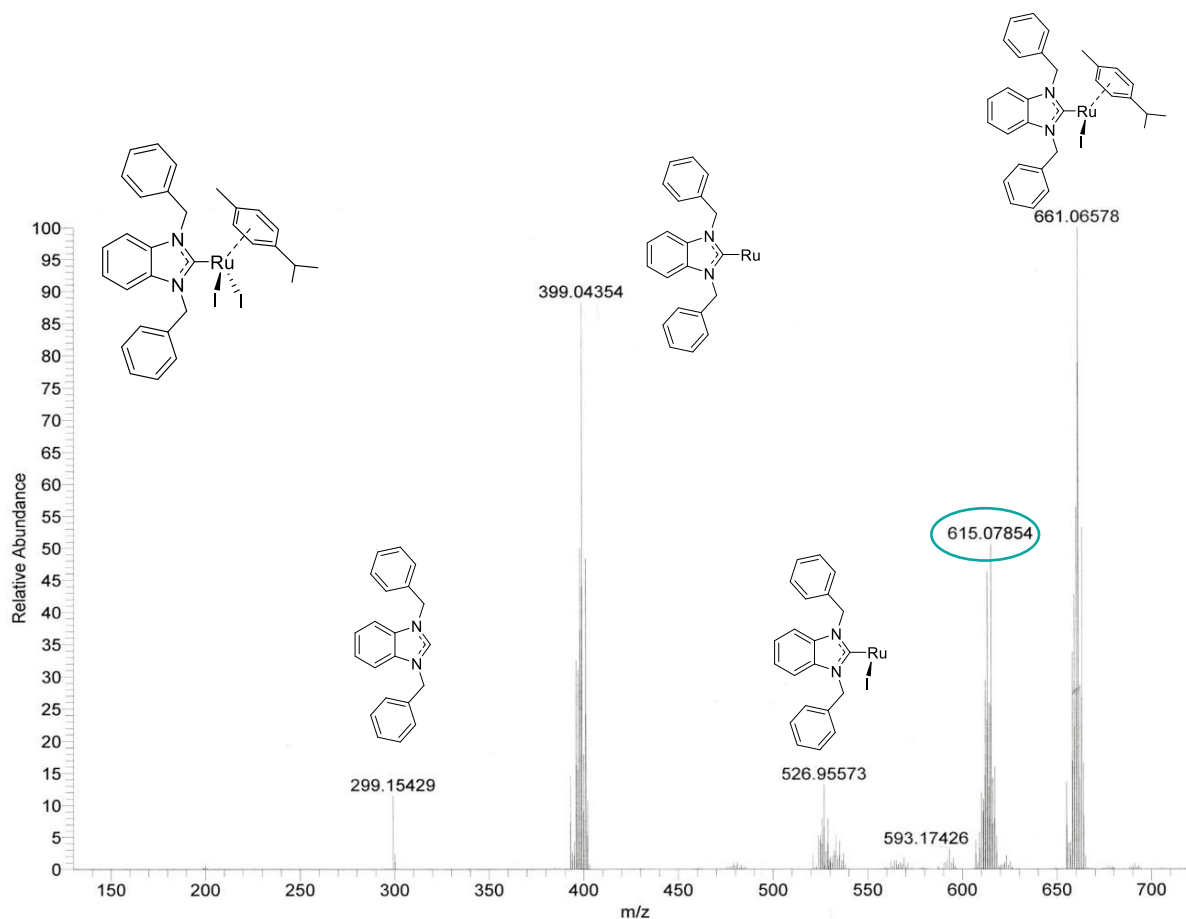


Abb. 29: Hochauflöstes ESI-Massenspektrum von **3aI** mit struktureller Zuordnung der jeweiligen Fragmente. Die grün-markierte Masse konnte zu Beginn nicht weiter zugeordnet werden.

Die Arbeitsgruppe um Hartinger et al. analysierte schließlich, dass es unter den bisher gewählten Bedingungen während der Transmetallierungsreaktion zu einem Halogenaustausch kommt. [151] Als Ausgangsverbindung zur Herstellung des NHC-Liganden wurde Benzimidazoliumbromid verwendet. Durch Zugabe von Silberoxid entsteht ein Silberintermediat. Durch Zusatz des Ruthenium-Dimers wird das Gegenion des Liganden als Silberbromid gefällt, was die treibende Kraft der Reaktion darstellt. Darüber hinaus bildet sich die Ruthenium-Carben-Bindung aus und der Ruthenium(II)-NHC-Komplex entsteht als Nebenprodukt (siehe Abb. 30).

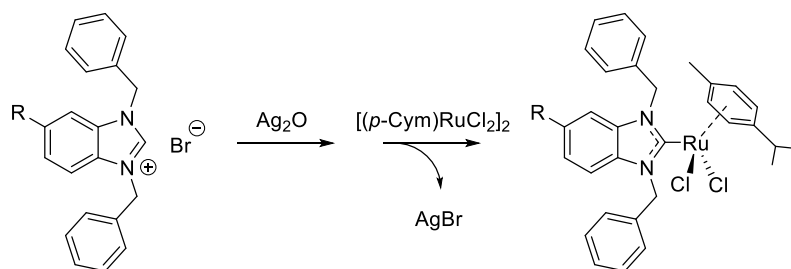


Abb. 30: Schematische Darstellung der Transmetallierungsreaktion mit $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ und bevorzugter Bildung von Silberbromid.

Bisher wurde als Ausgangsmetallfragment $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ verwendet. Für die Komplexe mit Iodido-Liganden wurde das entsprechende iodidierte Ruthenium-Dimer $[(p\text{-Cym})\text{RuI}_2]_2$ genutzt. Allerdings kann es hierbei zu einem Halogenaustausch zwischen den Bromiden der Benzimidazoliumbromide und den Iodiden des Ruthenium-Dimers kommen. Die Bindungsaffinität des Iodids an das Silber ist höher als der Bromide. Nach dem HSAB-Konzept fungiert Silber als weiche Säure und die Halogene als weiche Base. Iodid stellt hierbei die weichere Base dar, was in einer höheren Stabilität von Silberiodid gegenüber Silberbromid resultiert. [151]

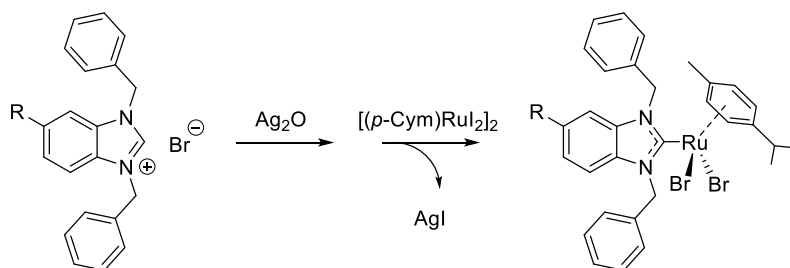


Abb. 31: Schematische Darstellung der Transmetallierungsreaktion mit $[(p\text{-Cym})\text{RuI}_2]_2$ und bevorzugter Bildung von Silberiodid.

Als treibende Kraft der Reaktion fällt Silberiodid aus, womit die Iodido-Liganden am Ruthenium gegen Bromido-Liganden am Rutheniumatom substituiert werden (siehe Abb. 31). Es bilden sich Gemische aus Komplexen mit Bromido- und Iodido-Liganden aus. Der Anteil der Bromido-Komplexe war so gering, dass er in der Elementaranalyse keinen Einfluss gezeigt hat und erst im Massenspektrum sichtbar wurde. Dies erklärt die zunächst nicht zuordenbare Masse bei $m/z = 615.08$ $[\text{M}-\text{Br}]^+$ im ESI-Spektrum, bei der es sich um den Bromido-Komplex handelt, bei dem einer der beiden Bromido-Liganden abgespalten wurde (grüne Markierung, Abb. 29).

Bei der Herstellung von Chlorido-Komplexen unter Verwendung von $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ tritt dieses Problem nicht auf, da es sich bei Bromid um eine weichere Lewis-Base als Chlorid handelt. Somit wird Silberbromid und der entsprechende Chlorido-Komplex bevorzugt gebildet (siehe Abb. 30).

Die Lösung des Problems stellt der Austausch des Gegenions des Benimidazoliumsalzes dar: Anstelle von Benzimidazoliumbromiden werden Benzimidazoliumiodide für die Transmetallierungsreaktion eingesetzt. So wird das jeweilige Benzimidazoliumbromid mit einem großen Überschuss an Kaliumiodid über 48 h zum Iodid umgesetzt (siehe Abb. 32).

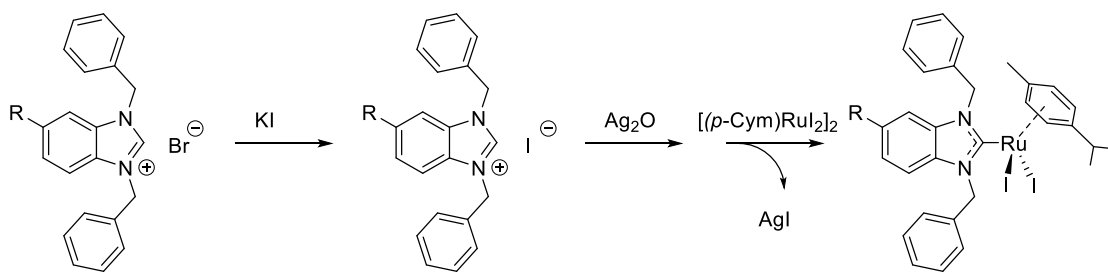


Abb. 32: Austausch des Gegenions des Benzimidazolsalzes und anschließende Transmetallierungsreaktion mit [(*p*-Cym)RuI₂]₂ und bevorzugter Bildung von Silberiodid.

Eine weitere Möglichkeit, die Problematik zu lösen, wäre die Durchführung der Benzilylierung mit Benzyljodid. Dieses ist zwar deutlich reaktiver als Benzylbromid, neigt aber an der Luft zur oxidativen Zersetzung und ist deshalb unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nicht empfehlenswert. [152]

3.3 Strukturaufklärung mittels Kristallstrukturanalyse

Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, konnten viele der neu synthetisierten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mittels Kristallisation in DCM / Ethylacetat gewonnen werden. So war es naheliegend, diese Kristalle durch Röntgenstrukturanalyse genauer untersuchen zu lassen, um einen Eindruck der räumlichen Anordnung der Moleküle zu erhalten. Leider stellte sich dabei heraus, dass (bisher) nur Komplex **3h** als vermessbarer Einkristall erhalten werden konnte. Hiervon konnte die Struktur aber röntgenkristallographisch gelöst werden (siehe Abb. 33). Der *p*-Cymol-Rest steht räumlich über dem Ruthenium-Atom und liegt dabei parallel zu einer Achse, die durch die beiden Benzyl-CH₂-Gruppen geht. Die Benzylreste schirmen die metallorganische Bindung zum Teil sterisch ab. Ein Benzylrest ist gewinkelt vom Imidazol-Grundkörper abgedreht.

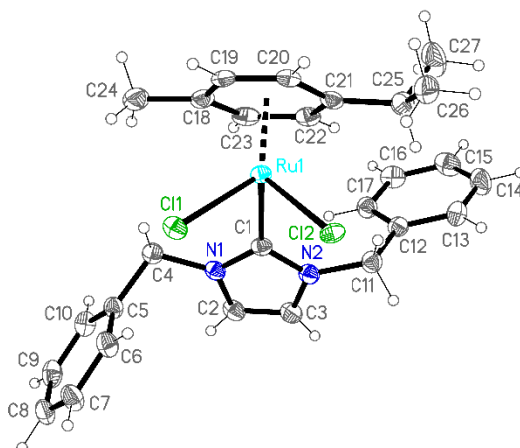


Abb. 33: Kristallstruktur von Komplex **3h**.

3.4 Besonderheiten bei der Interpretation von NMR-Spektren

Die NMR-Spektroskopie ist ein wichtiges Verfahren für die Reaktionskontrolle der synthetisierten Substanzen. Da diese aus einer Vielzahl an Protonen und Kohlenstoffen bestehen, stellt die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie eine Herausforderung dar. Besonders die aromatischen Grundkörper und Benzylseitenketten liefern eine große Anzahl an Signalen im aromatischen Bereich. Darüber hinaus kommt es bei den synthetisierten Rutheniumkomplexen zur Peakverbreiterung bei manchen Strukturelementen, wodurch sich die Signale häufig überlagern und die Auswertung der Spektren zusätzlich erschwert wird.

Deshalb konnte allein durch eindimensionale ^1H - und ^{13}C -Spektren die jeweiligen Protonen, bzw. Kohlenstoffe nicht eindeutig zugeordnet werden, weshalb auf 2D-NMR-Experimente zurückgegriffen wurde.

Im Folgenden werden als Beispiel für die Strukturaufklärung der synthetisierten Verbindungen die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren und ihre Auswertung für den NHC-Liganden **2c** vorgestellt. Darüber hinaus werden auch die Spektren des entsprechenden Metallkomplexes **3c** interpretiert und die Besonderheiten diskutiert.

3.4.1 Strukturaufklärung der Benzimidazoliumhalogenide mittels NMR-Spektroskopie (am Beispiel von **2c**)

3.4.1.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Der Erfolg der Benzylierung des Benzimidazols wird schnell am Spektrum ersichtlich. Besonders charakteristisch ist das Signal des Protons in 2-Position, welches mit 11.62 ppm stark ins tiefe Feld verschoben ist. An dieser Position wird im weiteren Verlauf der Komplexsynthese das Carben gebildet.

Durch die Benzylierung wird einer der Stickstoffe formal quaternisiert und trägt eine positive Ladung. Diese wird jedoch über die drei Atome N1-C2-N3 delokalisiert, was zu einer starken Entschirmung des Protons in 2-Position führt.

Die restlichen Protonen des Benzimidazols lassen sich über die Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten der Signale im aromatischen Bereich zuordnen. Je nach Stellung am Aromaten ergeben sich Kopplungsmuster mit charakteristischen Kopplungskonstanten:

Stellung am Aromaten	J [Hz]
ortho	7-10
meta	2-3
para	0.1-1

Tab. 4: Kopplungskonstanten von untereinander koppelnden Protonen am Aromaten.

Daraus ergibt sich folgendes Substitutionsmuster am Benzimidazol:

Strukturelement	ppm	J gemessen [Hz]	Kopplung mit	Kopplungsmuster
H4	7.02	2.3	H6	dd
		0.6	H7	
H6	7.05	9.1	H7	dd
		2.3	H4	
H7	7.43	9.1	H6	dd
		0.6	H4	

Tab. 5: Signalzuordnung der Benzimidazol-Protonen über die Kopplungskonstanten.

Auffallend ist, dass die Signale der Protonen H4 und H6 bei kleineren ppm-Werten erscheinen als das Signal des Protons H7. Dies liegt an der 5-Substitution des Benzimidazols. Die Methoxygruppe übt einen +M-Effekt auf das aromatische System aus, wodurch die Elektronendichte in *o*-Position zum Substituenten erhöht wird. [153] Damit werden die Kerne H4 und H6 stärker abgeschirmt und es kommt zu einer Verschiebung der Signale zu kleineren ppm-Werten.

Die CH₃-Gruppe des Methoxy-Substituenten bildet ein Singulett bei 3.8 ppm. Durch den induktiven Effekt des Sauerstoffs wird die Methylgruppe entschirmt und die chemische Verschiebung liegt in relativ tiefem Feld. Die CH₂-Gruppen der Benzylseitenketten liefern kein gemeinsames Signal, sondern zwei Singuletts bei 5.86 ppm und 5.81 ppm. Durch die Substitution in der 5-Position ist das Molekül nicht mehr symmetrisch, so dass die Benzylgruppen chemisch inäquivalent sind.

Dieser Effekt tritt bei unsubstituierten (Benz-)imidazolderivaten nicht auf. Vergleicht man die Spektren mit denen der Substanzen **2a** und **2h**, ergeben dort die CH₂-Gruppen ein Singulett, da durch die Symmetrie im Molekül die CH₂-Gruppen chemisch äquivalent vorliegen.

Dasselbe gilt für die aromatischen Protonen der Benzylseitenketten: Diese können den Multipletts bei 7.55 – 7.52 ppm (2H), 7.50 – 7.46 ppm (2H), 7.36 ppm (3H) und 7.33 ppm (3H) zugeordnet werden. Eine genauere Festlegung kann durch ein ¹H-NMR-Spektrum nicht erfolgen. Die bisherige Zuordnung der Protonen ist Abb. 34 zu entnehmen.

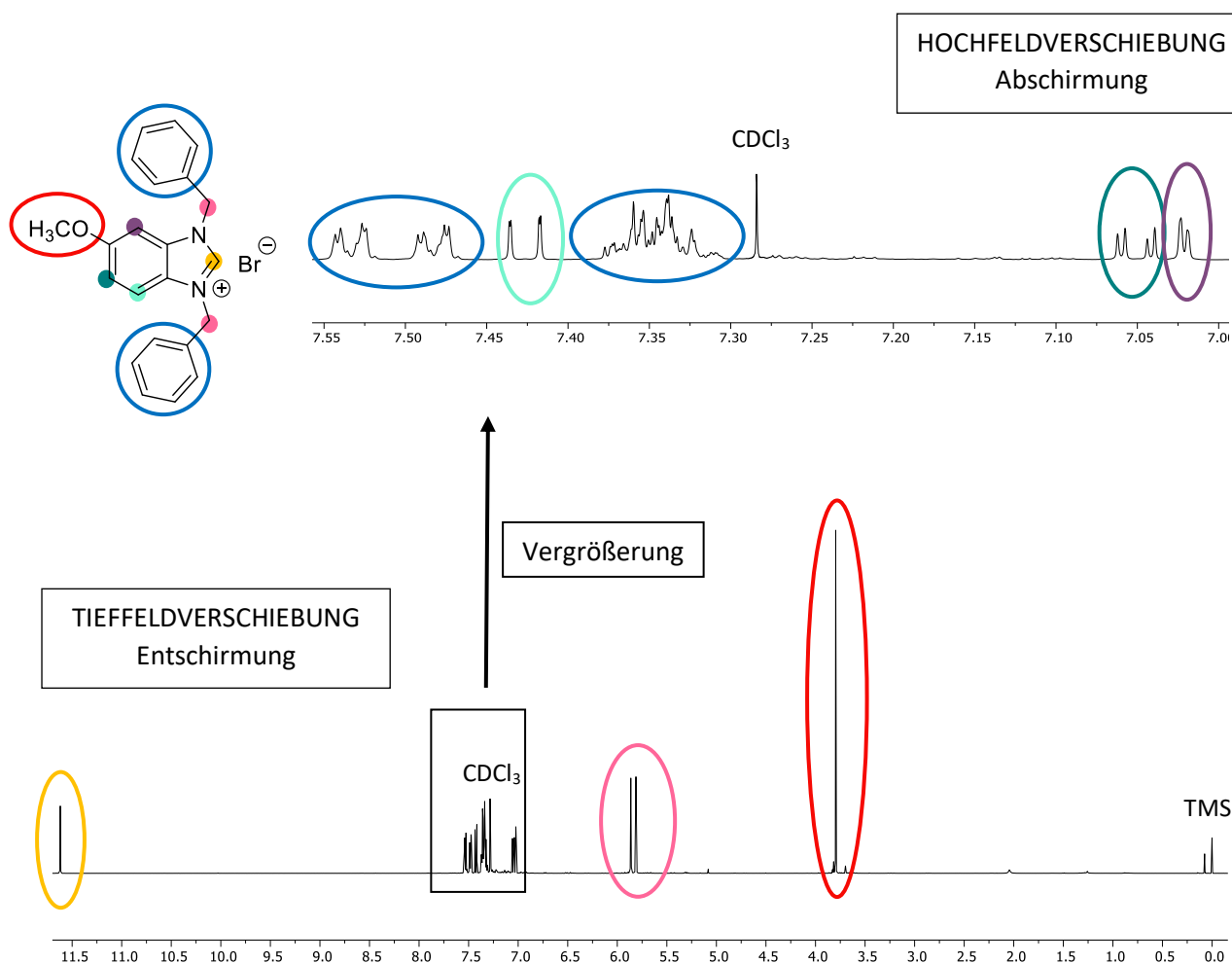


Abb. 34: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **2c** mit Vergrößerung des aromatischen Bereichs und Signalzuordnung innerhalb der Struktur.

3.4.1.2 ^{13}C -Spektroskopie

Auch im ^{13}C -NMR zeigen sich die Effekte der Entschirmung: Der Kohlenstoff C2 ist mit 141.9 ppm ins tiefe Feld verschoben. Dieser Effekt ist beim quartären Kohlenstoff C5 des Benzimidazols, der den Methoxy-Substituenten trägt, noch stärker ausgeprägt. Das Signal liegt bei 159.3 ppm. Weitere Zuordnungen lassen sich der Abb. 35 entnehmen:

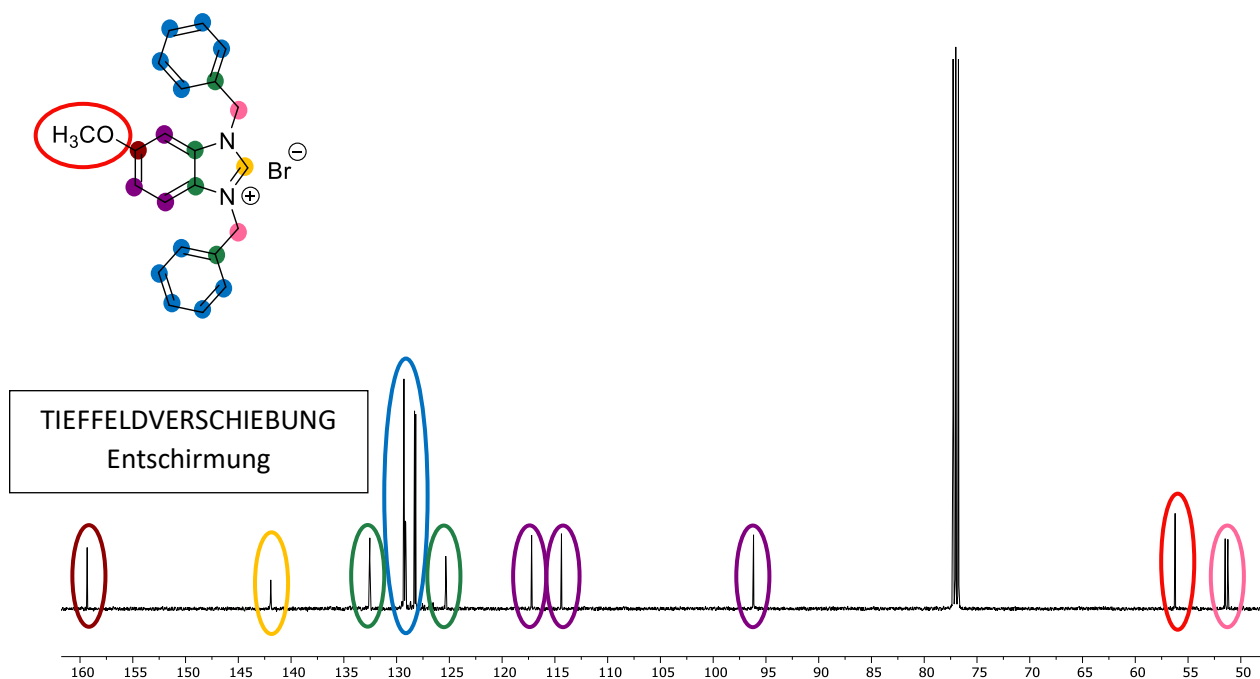
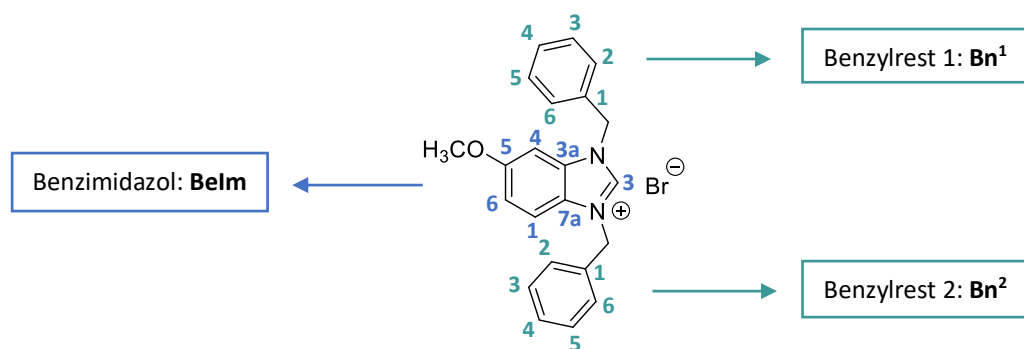
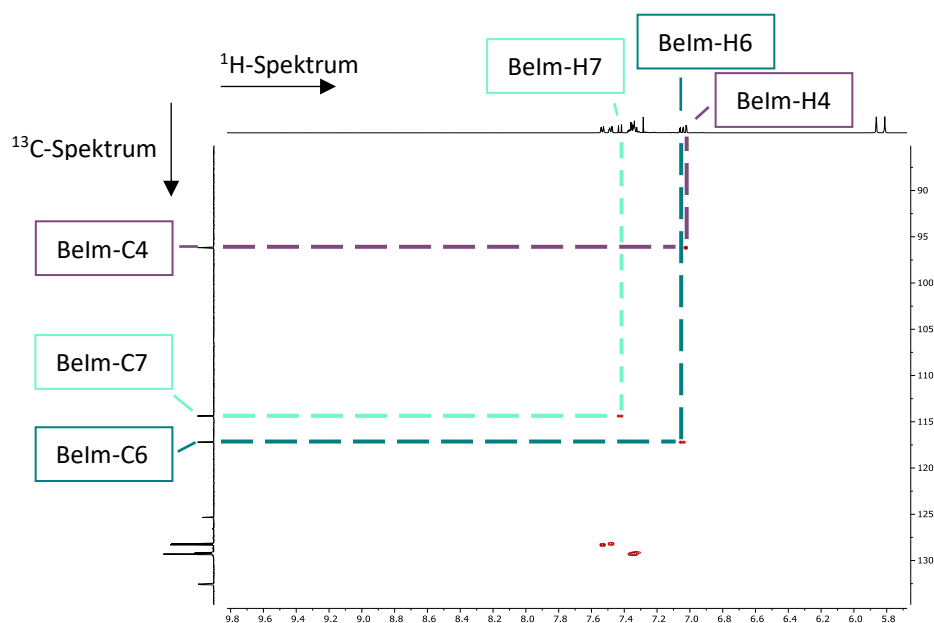


Abb. 35: ^{13}C -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **2c** mit Vergrößerung des aromatischen Bereichs und Signalzuordnung innerhalb der Struktur.

3.4.1.3 2D-Experimente

Um eine eindeutige Zuordnung der Protonen- zu den Kohlenstoffsignalen zu bekommen, muss auf 2D-Experimente zurückgegriffen werden. Diese stellen auf beiden Achsen die Frequenz unterschiedlicher Spektren dar. Normalerweise sind bei NMR-Spektren auf der Abszisse die Frequenzachse, auf der die chemische Verschiebung abzulesen ist, und auf der Ordinate die Intensität abgebildet. Das ^1H , ^{13}C -HSQC (=Heteronuclear Single Quantum Coherence) ist ein Verfahren, um die Korrelation zwischen ^1H - und ^{13}C -Resonanzen über eine Bindung darzustellen. [153] Am oberen Rand ist das ^1H -NMR-Spektrum dargestellt, am linken Rand das ^{13}C -NMR-Spektrum. Anhand der Korrelationspeaks (gestrichelte Linien im Spektrum, Abb. 37) lässt sich eine Zuordnung der beiden Resonanzen zueinander treffen. In Abb. 37 sind exemplarisch die Zuordnungen der Protonen des Benzimidazols zu den entsprechenden Kohlenstoffen dargestellt.

Der Abb. 36 kann man die verwendeten Abkürzungen und Bezifferungen innerhalb von **2c** entnehmen.

Abb. 36: Abkürzungen und Bezifferungen der Substanz **2c**.Abb. 37: Ausschnitt eines ¹H,¹³C-HSQC-Spektrum (600 MHz, CDCl₃) von **2c**.

Das Experiment ¹H,¹³C-HMBC (=Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ermöglicht die Gegenüberstellung von ¹H-Resonanzen zu ¹³C-Resonanzen, die über 2-3 Bindungen hinweg miteinander koppeln, womit die Kerne eine sehr kleine Kopplungskonstante besitzen. [153] Das zweidimensionale homonukleare Experiment ¹H,¹H-COSY (=Correlated Spectroscopy) zeigt die Kopplung zweier vicinaler Kerne auf. [153]

In der Tab. 6 sind die entscheidenden Korrelationen dargestellt. Die 2D-Experimente lieferten noch zahlreiche weitere Korrelationspeaks. Dargestellt sind hierbei nur die Signale, die zur endgültigen Strukturaufklärung entscheidend beigetragen haben. Durch die genaue Zuordnung der Protonen am Benzimidazol, konnten über das HSQC die jeweiligen Signale im ¹³C-Spektrum festgelegt werden. Darüber hinaus lieferten die Protonen des Benzimidazols im HMBC Korrelationen zu den quartären

Kohlenstoffen des Benzimidazols C3a_{quart.} und C7a_{quart.}. Diese wiederum zeigten die entsprechenden Korrelationspeaks zu den CH₂-Gruppen der Benzylreste, wodurch die CH₂-Gruppen den jeweiligen Resten genau zugeordnet werden konnten. Die CH₂-Gruppen korrelierten wiederum mit dem C1_{quart.} des jeweiligen Benzylrings im HMBC. Der Kohlenstoff C1 der Benzylreste koppelt im HMBC mit den Protonen in ortho-Position (H2 und H6) des aromatischen Rings. Das Experiment COSY lieferte zum Schluss die Korrelation der aromatischen Protonen der Benzylseitenketten untereinander.

Strukturelement	Ausgangssignal [ppm]		Korrelationspeak im 2D-Experiment [ppm]		
	1H-NMR	13C	HSQC	HMBC	COSY
Belm-H4	7.02		96.18	125.34	
Belm-H6	7.05		117.21	159.32	
Belm-H7	7.43		114.4	132.54	
Bn ¹ -CH ₂ (2H)	5.81		51.2	125.34 132.55	
Bn ² -CH ₂ (2H)	5.86		51.5	132.54 132.63	
Belm-C3a _{quart.}		125.34		7.02 5.81	
Belm-C7a _{quart.}		132.54		7.43 5.86	
Bn ¹ -C1 _{quart.}		132.55		5.81 7.48	
Bn ² -C1 _{quart.}		132.63		5.86 7.53	
Bn ¹ (2H)	7.48		128.18	132.55	7.33 (3H)
Bn ² (2H)	7.53		128.30	132.63	7.36 (3H)

Tab. 6: Signalzuordnung der Substanz **2c** unter Auswertung der Korrelationspeaks in 2D-Experimenten.

Die endgültige Strukturzuordnung wird an folgenden NMR-Spektren (siehe Abb. 38 und Abb. 39) verdeutlicht:

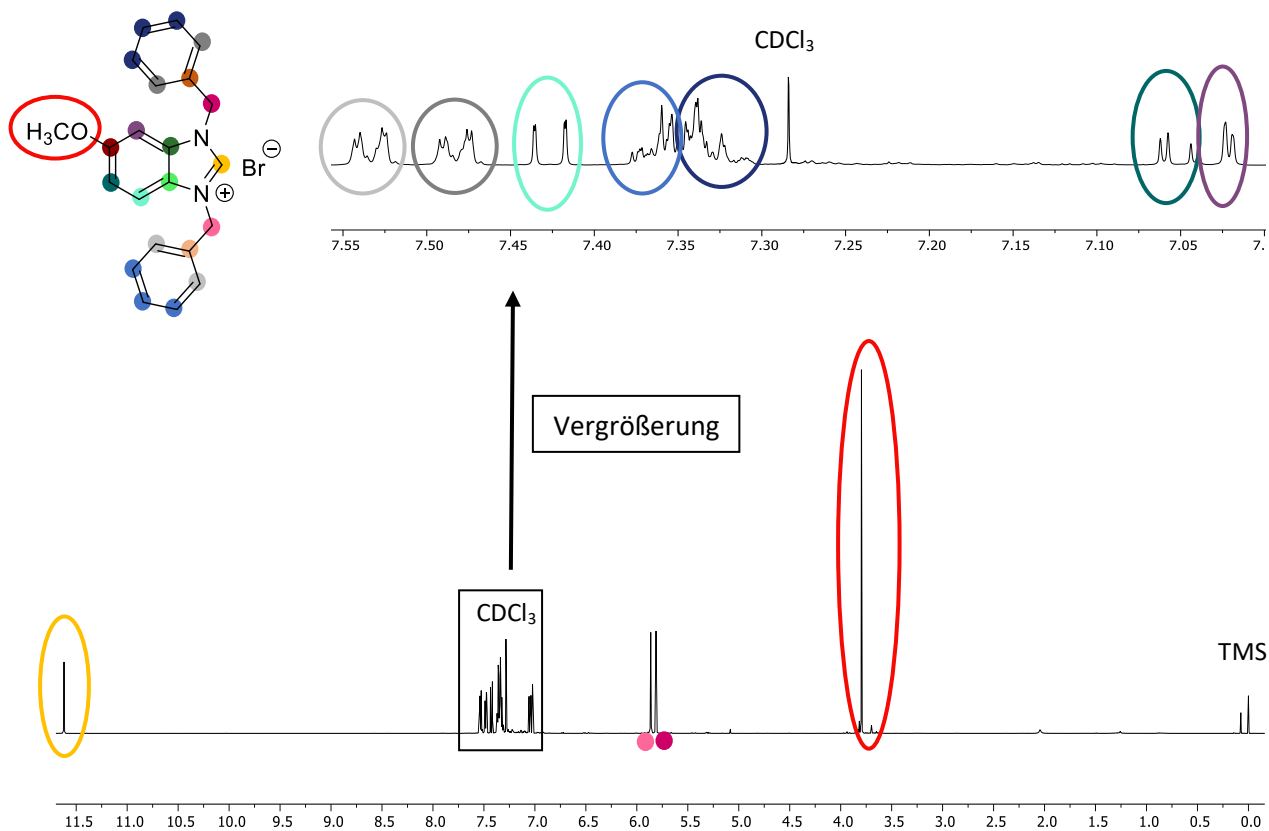


Abb. 38: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **2c** mit Vergrößerung des aromatischen Bereichs und endgültige Signалуordnung innerhalb der Struktur.

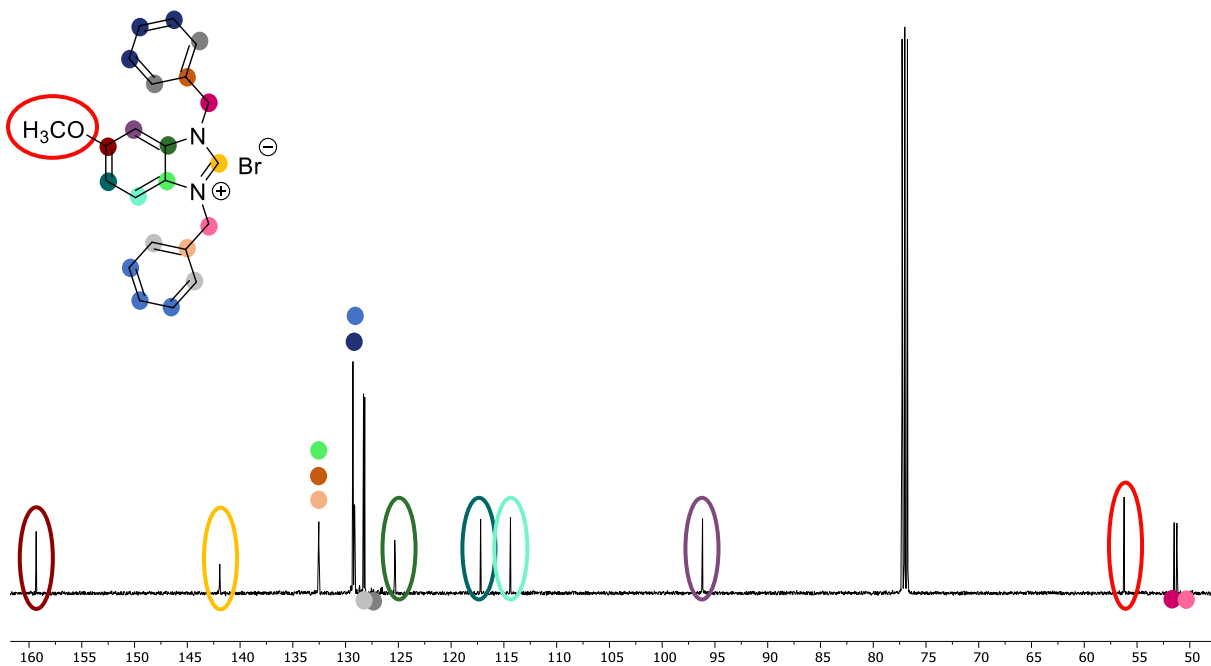


Abb. 39: ^{13}C -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **2c** und endgültige Signалуordnung innerhalb der Struktur.

Zur vollständigen Strukturaufklärung wurde zur Absicherung ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC (=Heteronuclear Multiple Bond Correlation) aufgenommen. Dieses Verfahren ermöglicht, wie das vorgestellte $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC, die Darstellung der Korrelationen über mehrere Bindungen. Hierbei werden die Korrelationen der Kerne im ^1H -Spektrum gegenüber ^{15}N - anstelle von ^{13}C -Resonanzen aufgezeigt. Die ^{15}N -Resonanzen werden dabei als Projektion aus dem zweidimensionalen-Spektrum heraus gewonnen, so dass kein eigenständiges ^{15}N -NMR-Spektrum gemessen werden muss. Dies wäre auf Grund der geringen Sensitivität des ^{15}N -Isotops messtechnisch nur äußerst schwer zu realisieren.

In diesem Fall korreliert das Belm-H2-Signal mit nur einem einzigen ^{15}N -Signal. Damit weisen die beiden Stickstoffe Belm-N1 und Belm-N3 die gleiche chemische Verschiebung auf. Damit kann gezeigt werden, dass die positive Ladung des Moleküls über beide Stickstoffe delokalisiert und damit gleichmäßig mesomeriestabilisiert vorliegt. Wäre dies nicht der Fall, wäre die chemische Verschiebung ungleich und es würden dann zwei Korrelationspeaks im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC auftreten.

3.4.2 Strukturaufklärung der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mittels NMR-Spektroskopie (am Beispiel von **3c**)

Mittels NMR-Spektroskopie konnte auch die erfolgreiche Durchführung der Transmetallierung kontrolliert werden. Besonders auffallend ist das Verschwinden des Belm-H2 Signals bei 11.6 ppm (gelbe Markierung, Abb. 40) im ^1H -NMR-Spektrum. Dafür tritt im ^{13}C -NMR eine deutliche Tieffeldverschiebung des Belm-C2-Kohlenstoffs von 142 ppm zu 190 ppm auf (gelbe Markierung, Abb. 45), woran ersichtlich ist, dass dieses C-Atom seinen Bindungscharakter verändert hat und eine Carben-Metall-Bindung entstanden ist. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass als Maßstab für die beobachtete chemische Verschiebung der unkomplexierte Carben-Kohlenstoff herangezogen werden muss, die oft weit jenseits der 200 ppm-Marke liegt. [154] In Abhängigkeit von den Lewis Eigenschaften des komplexierenden Metallatoms und den Donor-Eigenschaften des Carbens beobachtet man dann eine unterschiedlich starke Hochfeldverschiebung, die hier zu dem oben angegebenen Wert von 190 ppm führt. [154,155]

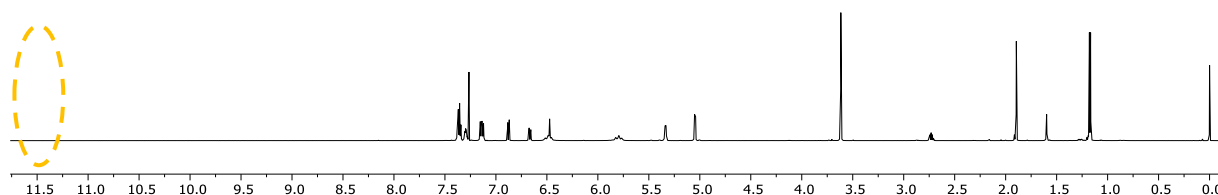


Abb. 40: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **3c**. Durch Löschen des Signals von Belm-H2 bei 11.6 ppm (gelb-gestrichelte Markierung) ist die erfolgreiche Komplexbildung sichtbar.

Hinzu kommen die weiteren Signale des Rutheniumfragments. Auffallend ist hierbei die Isopropyl-Gruppe des *p*-Cymolfragments, welche insbesondere durch die CH-Gruppe als Septett bei 2.73 ppm auffällig wird (hellviolette Markierung, Abb. 44). Anhand dieses Signals lässt sich erkennen, dass das Rutheniumfragment nicht im Überschuss vorliegt und der Komplex rein erhalten wurde, da bei ungenügender Aufreinigung ein weiteres Septett mit einer kleineren chemischen Verschiebung bei höheren ppm Werten im NMR-Spektrum auftritt. Des Weiteren überlagern sich die aromatischen Protonen der beiden Benzylseitenketten, wobei jeweils die *o*-Protonen und die *m*- und *p*-Protonen ein gemeinsames Signal bilden.

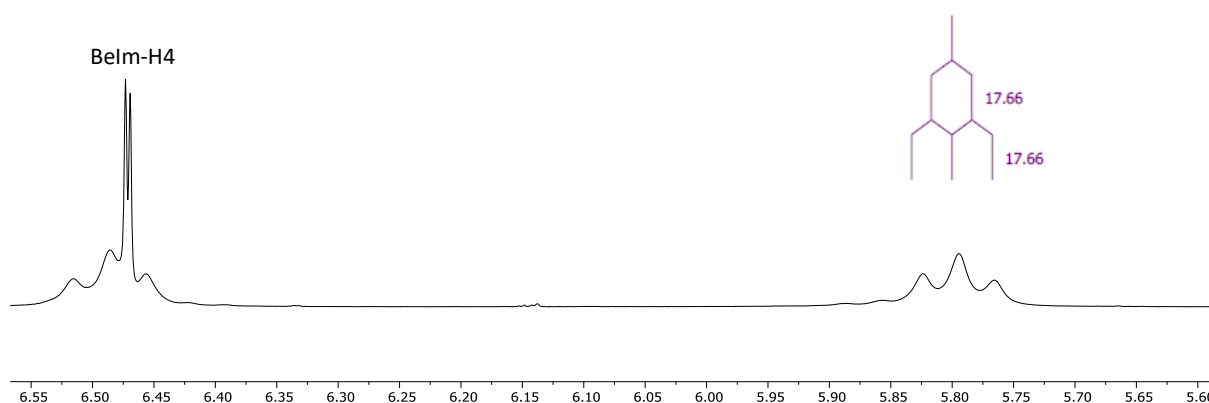


Abb. 41: Vergrößerte Darstellung des ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **3c** mit den Signalen der CH_2 -Gruppen der Benzylseitenketten am Benzimidazol.

In Abb. 41 sind die CH_2 -Gruppen der Benzylseitenketten vergrößert dargestellt. Das Tripletts entsteht aus der Überlagerung von zwei Dupletts. Jeweils 1 H der beiden CH_2 -Gruppen bildet ein Duplett. Die CH_2 -Gruppen sind damit nicht vollkommen äquivalent, sondern haben leicht unterschiedliche chemische Verschiebung. Die beiden Einzelprotonen jeder CH_2 -Gruppe haben dagegen vollkommen unterschiedliche Verschiebung. Das zeigt sich auch an der Kopplungskonstante mit 17.66 Hz, was auf eine geminale Kopplung schließt. Diese tritt zwischen den Protonen einer CH_2 -Gruppe auf, wenn diese nicht chemisch äquivalent vorliegen und die Protonen diastereotrop sind. [153]

Des Weiteren liefern die Signale der CH_2 -Benzylgruppen im Vergleich zu dessen Liganden **2c** keine scharfen Peaks mehr, sondern zeigen starke Peakverbreiterungen. Zuerst war die Vermutung, die Ursache könnte in den paramagnetischen Eigenschaften des Rutheniums liegen, die sich in der NMR-Spektroskopie bemerkbar machen. [156] Ruthenium(III) besitzt in der 4d-Schale fünf Elektronen, von denen eins ungepaart vorliegt. Dadurch wird eine schnelle Kern-Spin-Relaxation ausgelöst. [157] Die Relaxationszeiten stellen in der NMR-Spektroskopie die Zeit dar, die das System benötigt, um das Gleichgewicht wieder zu erreichen, nachdem bei einem NMR-Experiment durch Einstrahlen der Resonanzfrequenz das thermische Gleichgewicht des Spinsystems gestört wurde. [153]

Je kürzer die Relaxationszeiten sind, desto breiter werden die Linien im Spektrum. Paramagnetische Bestandteile, wie Ruthenium(III) es darstellt, verkürzen die Relaxationszeiten und die Peaks verbreitern sich. [153] Dieser Effekt gilt allerdings nur für Rutheniumkomplexe mit der Oxidationsstufe +III. [156] Die neu synthetisierten Komplexe liegen reduziert in der Oxidationsstufe +II vor, wodurch das Rutheniumatom sechs Elektronen im d-Orbital besitzt und diamagnetische Eigenschaften aufweist.

Die Peakverbreiterungen der CH₂-Benzylgruppen müssen also dynamischer Ursache sein. Durch die Komplexbildung ist die freie Rotation der Benzylgruppen offenbar nur noch eingeschränkt möglich. Anhand der Kristallstruktur von **3h** (siehe Abb. 33) wird ersichtlich, dass der *p*-Cymol-Rest in Richtung der Benzimidazolebene ausgerichtet ist. Leider konnte von **3c** keine Kristallstruktur erhalten werden, weshalb eine Struktur mittels der Dichte-Funktional-Theorie (DFT) berechnet wurde (siehe Abb. 42).

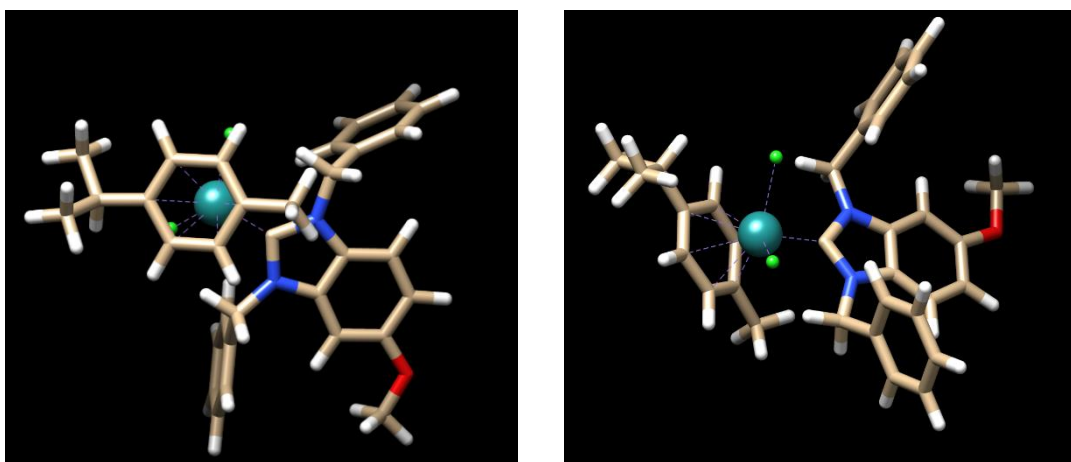


Abb. 42: Berechnete Strukturen von **3c**, links: Ansicht auf den *p*-Cymol-Rest, rechts: zentrale Ansicht auf das Rutheniumatom.

In der linken Abbildung wird erkennbar, wie der *p*-Cymol-Rest in Richtung des Benzimidazols zeigt. Die Benzylseitenketten befinden sich in räumlicher Nähe zum *p*-Cymol-Rest. Die Drehbarkeit ist dadurch eingeschränkt und die Drehung findet vermutlich langsamer statt. Im rechten Bild sieht man, dass sich jeweils nur ein Proton der CH₂-Gruppen in räumlicher Nähe zu jeweils einem Chlorido-Liganden befindet. Zusätzlich werden die beiden Protonen auch unterschiedlich durch den Ringstromeffekt des *p*-Cymol-Aromaten beeinflusst. Das führt zu einer unterschiedlichen chemischen Umgebung der beiden Protonen an der CH₂-Gruppe, so dass eine chemische Verschiebungsdifferenz von ca. 0.7 ppm resultiert.

Die Peakverbreiterungen im NMR können damit auf dynamische Prozesse zurückgeführt werden. [153] Die Effekte können auftreten, wenn Rotationen von Bindungen gehindert sind und wenn Kerne, wie in dem Beispiel die CH₂-Gruppen, sich in verschiedener magnetischer Umgebung befinden. Die langsame

Bewegung erzeugt im NMR-Spektrum verbreiterte Linien. Bei Erhöhung der Temperatur während der Messung müsste die Rotationsbarriere überwunden werden, da dann eine genügend große Zahl von Platzwechseln vorliegt und die Protonen der CH₂-Gruppen damit nicht mehr spektroskopisch unterscheidbar sind. [153]

Die Ausrichtung des *p*-Cymol-Restes über das Benzimidazol hat noch eine weitere Folge: der Aren-Ring des *p*-Cymols übt einen Ringstromeffekt auf die aromatischen Protonen des Benzimidazols aus, wodurch eine chemische Abschirmung und damit eine Hochfeldverschiebung der Protonen Belm-H4, Belm-H6 und Belm-H7 um 0.55 ppm erzeugt wird.

Außerdem fällt auf, dass die Signale der aromatischen Protonen des *p*-Cymol-Restes ins hohe Feld zu ca. 5.05 und 5.25 ppm verschoben sind. Dies liegt an der koordinativen Bindung des Cymols zum Ruthenium. Die d-Orbitale des Metalls üben eine π -Rückbindung zu den antibindenden π^* -Orbitalen des Aren-Rings aus, was zur Folge hat, dass die entsprechenden Protonen zu kleineren ppm Werten verschoben werden. [154]

Um nachzuweisen, dass die beiden CH₂-Gruppen-Signale tatsächlich jeweils nur ein Proton der beiden unterschiedlichen Gruppen repräsentieren und nicht eine komplette CH₂-Gruppe mit 2 Protonen, wurde ein NOESY bzw. EXSY-Spektrum aufgenommen. Hierbei treten Korrelationspeaks, die durch einen dynamischen Austausch verursacht werden, in der gleichen Phase wie die Diagonalpeaks auf (hier also blau, siehe Abb. 43). Peaks, die durch räumliche Nachbarschaft begründet sind und auf dem NOE-Effekt beruhen, erscheinen dagegen mit entgegengesetzter Phase (rot). Hier kann man sehen, dass ein starker EXSY-Korrelationspeak zwischen den beiden CH₂-Gruppen-Signalen besteht. Dies ist der Beleg dafür, dass jeweils das eine Proton jeder CH₂-Proton durch verlangsamte Rotation in die Position des anderen Protons überführt wird, das sich in seiner chemischen Umgebung deutlich unterscheidet. Im Vergleich dazu sind die beiden roten NOE-Korrelationspeaks zwischen den aromatischen Protonensignalen H-4, welches ein CH₂-Gruppensignal überlagert, sowie H-6 und den Protonen der Methoxy-Gruppe zu beobachten.

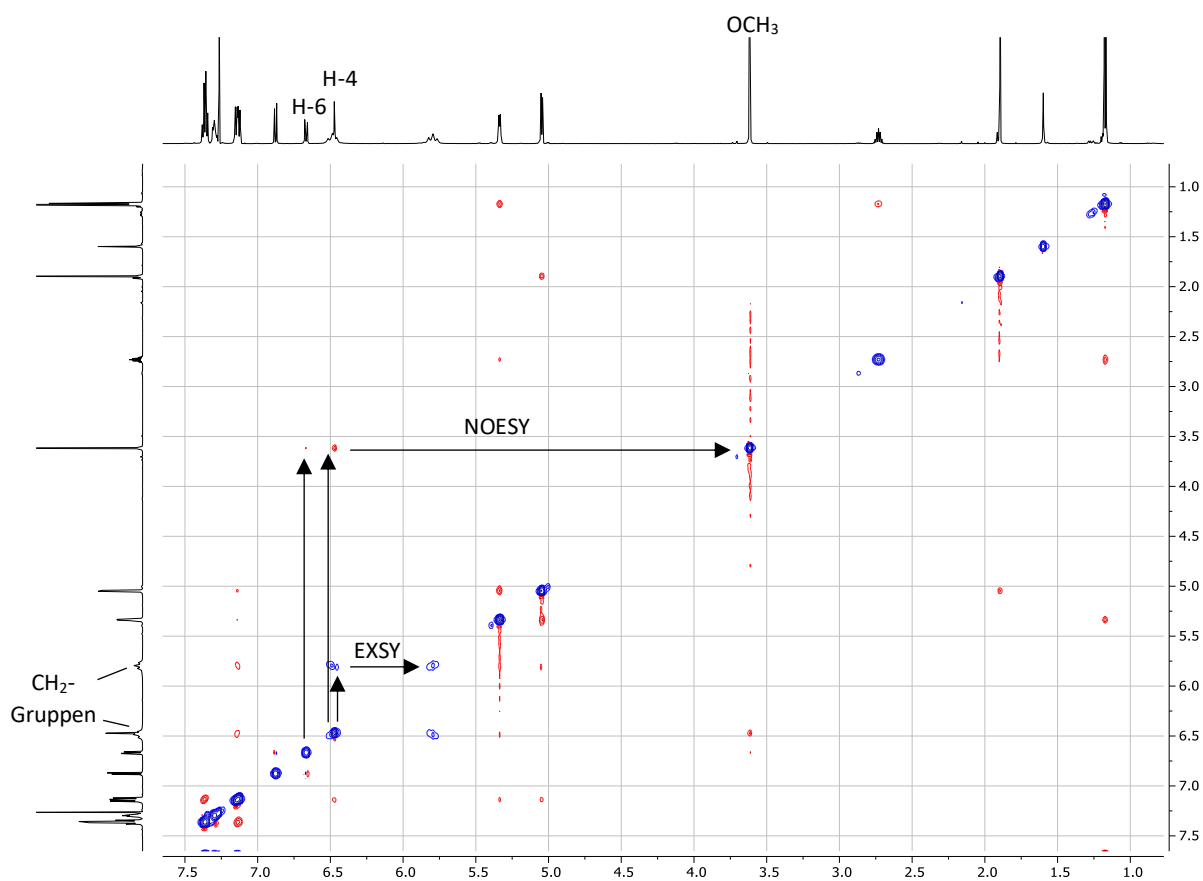


Abb. 43: NOESY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **3c**. Die mit Pfeilen versehenen roten Korrelationspeaks sind auf den NOE-Effekt zurück zu führen, die blauen Korrelationspeaks auf dynamische Austauschprozesse.

Die komplette Signalzuordnung von Substanz **3c** ist den Spektren den Abb. 44 und Abb. 45 auf der folgenden Seite zu entnehmen.

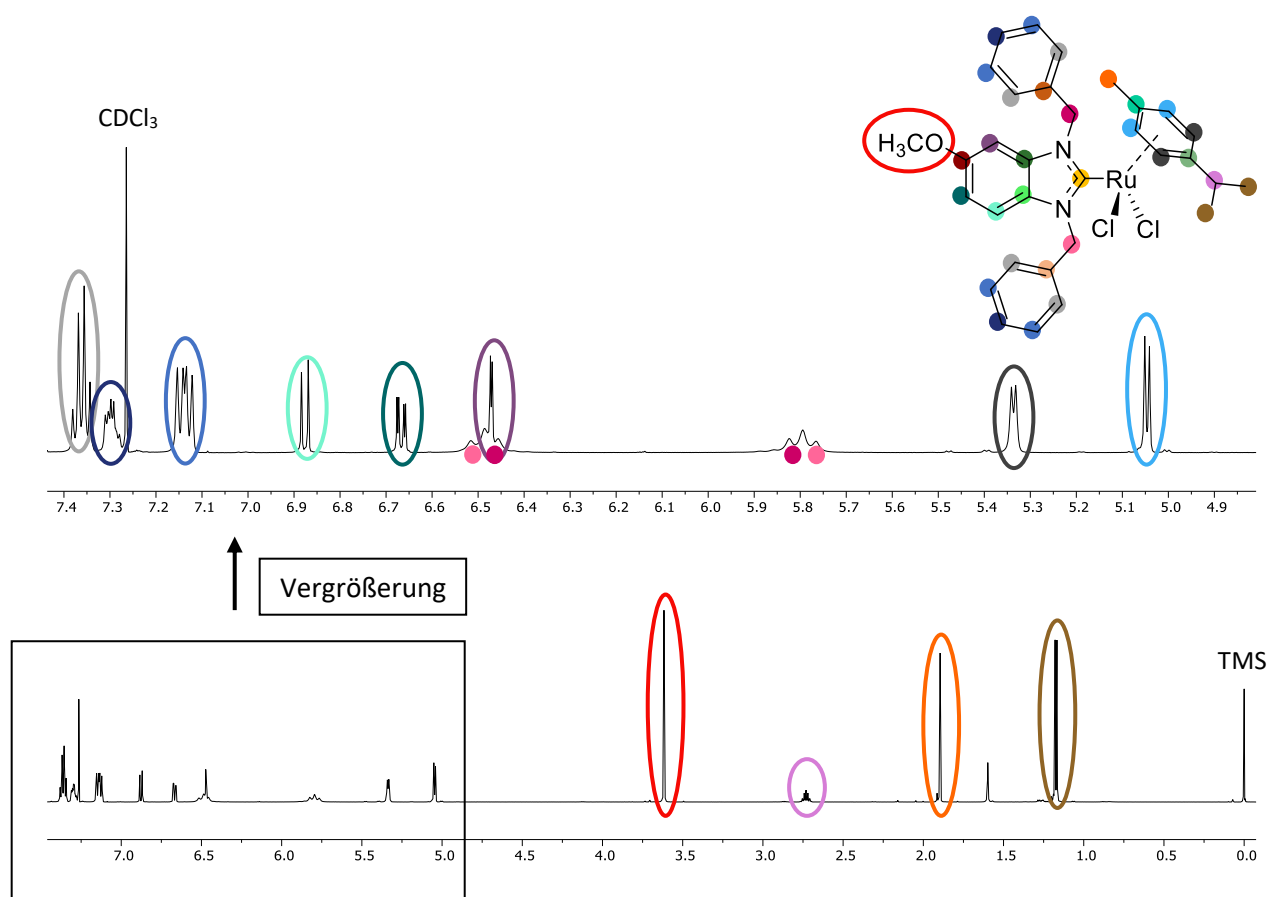


Abb. 44: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **3c** mit Vergrößerung des aromatischen Bereichs und endgültige Signalzuordnung innerhalb der Struktur.

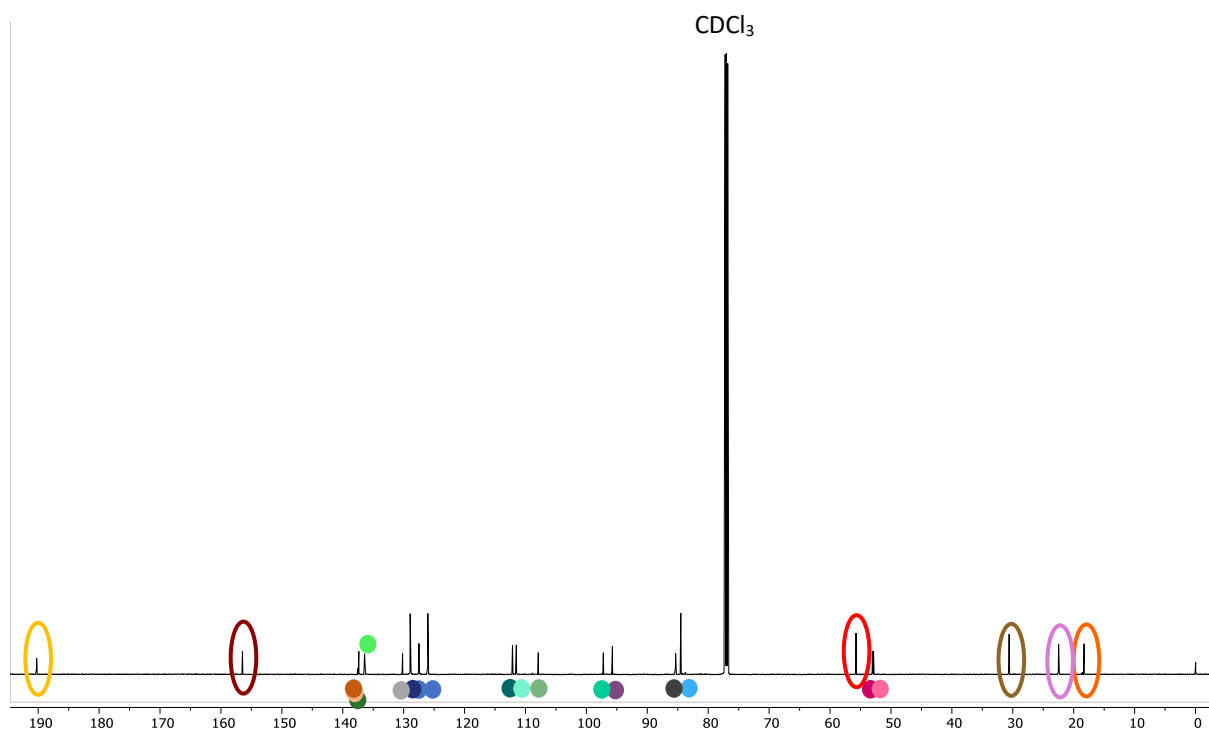


Abb. 45: ^{13}C -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **3c** und endgültige Signalzuordnung innerhalb der Struktur.

4. Evaluation potenzieller zytotoxischer Wirkmechanismen

In der Krebsforschung gibt es unterschiedliche Möglichkeiten neue potenzielle Wirkstoffe zu untersuchen. Die Anforderungen an ein Arzneimittel sind in verschiedenen Gesetzen verankert. So fordert das deutsche Arzneimittelgesetz (AMG) die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels (§1 AMG). [158] Ein wichtiger Bestandteil ist hierbei die Prüfung auf Toxizität, die nicht nur ein Teil der Prüfung auf Unbedenklichkeit darstellt und von Richtlinien, wie den ICH Guidelines, vorgegeben wird. [159] Im Fall der Wirkstoffentwicklung von potenziellen Zytostatika geht die Prüfung der Zytotoxizität auch mit der Prüfung des Wirkmechanismus einher. Häufig werden neue Substanzen synthetisiert und *in vitro* Studien durchgeführt, um erste Zielstrukturen zu definieren und Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können. [160] Erst bei den vielversprechendsten Substanzen schließen sich klinische Studien an, welche durch die Zulassungsbehörden wie die EMA strikt reguliert sind. [161,162] Damit sind *in vitro* Studien unabdingbar und bilden die Grundlage der Wirkstoffentwicklung und präklinischen Studien.

Erste Anhaltspunkte für die Wirksamkeit eines Antitumorstoffes liefert die Bestimmung des IC_{50} -Wertes an verschiedenen Krebszelllinien. Der IC_{50} -Wert stellt die Konzentration dar, bei der die Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 50 % verringert wird. So hat das National Cancer Institute (NCI) in den USA das NCI60 Screening etabliert, bei dem der IC_{50} -Wert von potenziellen Wirkstoffen an 60 verschiedenen Krebszelllinien bestimmt wird. [163] Diese Methode liefert nicht nur ein breites Screening an unterschiedlichen Krebszelllinien, sondern auch bereits zugelassene Wirkstoffe können in neuen Kombinationen getestet werden, um mögliche Kombinationstherapien zu erforschen. Durch diese Screening Methode ist die weltweit größte pharmakologische Datenbank zum Thema Krebs entstanden. [164] Drei von den verwendeten Krebszelllinien, HT-29, MCF-7 und MDA-MB-231, wurden auch in dieser Arbeit zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes herangezogen (siehe Kapitel 8.7).

Man kann bei der Bestimmung des IC_{50} -Wertes zwischen zytostatischen und zytotoxischen Eigenschaften unterscheiden (siehe Kapitel 4.1). Zytotoxische Stoffe führen den Zelltod herbei und verringern die Zellzahl drastisch, weil z.B. Apoptose-induzierende Eigenschaften ursächlich sind. Zytostatische Substanzen hingegen besitzen einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation, wodurch die Zellen sich nicht mehr vermehren können, töten die Zellen jedoch nicht zwingend. Um die neu synthetisierten Substanzen unter diesen Gesichtspunkten besser klassifizieren zu können, wurden Videomikroskopaufnahmen (Life-Cell Imaging) angefertigt, um Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen unter Substanzzugabe sichtbar zu machen (siehe Kapitel 4.2). In Kooperation mit Dr. Dr. Aram Prokop des Kinderkrankenhauses in Köln wurden die Apoptose-induzierenden Eigenschaften untersucht (siehe Kapitel 4.4).

Ein wichtiges Schlüsselenzym für die Regulation der Redoxprozesse in einer Zelle bildet das Enzym Thioredoxinreduktase (TrxR) als Teil des Thioredoxin-Redox-Systems. Dieses reguliert die Zellhomöostase und das Zellwachstum und ist bei oxidativem Stress in der Lage die Apoptose einzuleiten. Die Inhibition dieses Enzyms sowohl durch die Liganden als auch die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe wurde in Kapitel 4.5 ausführlich untersucht.

4.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels Kristallviolettassay

Für die Bestimmung der Zellviabilität haben sich verschiedene Testverfahren in der Forschung etabliert. [165] Mittels der Bromdesoxyuridin-Färbung kann die Zellproliferation bestimmt werden. Bromdesoxyuridin wird als Thymidinanalogon in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut, und kann letztendlich immunhistochemisch detektiert werden. [166] Die meisten Methoden beruhen auf der kolorimetrischen Testung der Integrität zellulärer Membranen durch Zugabe von Farbstoffen, die bestimmte Zellorganellen anfärben können. Nicht alle Farbstoffe können in intakte Zellmembranen gelangen. So wird Propidiumiodid (siehe Abb. 47) nur in bereits abgestorbene Zellen aufgenommen und kann dort in doppelsträngige Nukleinsäuren interkalieren. [167] Neben der Propidiumbromidfärbung handelt es sich auch bei Ethidiumbromid um einen Farbstoff zur Bestimmung der Anzahl toter Zellen. [168]

Eine der bekanntesten Methoden zur Bestimmung der Zellviabilität lebender Zellen, stellt der MTT-Test dar. Diese Färbemethode beruht auf der Umwandlung des wasserlöslichen, gelb gefärbten Tetrazoliumsalz (genauer: 4,5-Dimethylthiazol-2-yl-[2,5-diphenyl]tetrazoliumbromid (MTT)) zum violett gefärbten Formazan-Produkt. (siehe Abb. 46) Diese Reaktion wird katalysiert durch Dehydrogenase-Enzyme in Mitochondrien lebender Zellen. Bereits abgestorbene Zellen katalysieren diese Reaktion nicht. [169]

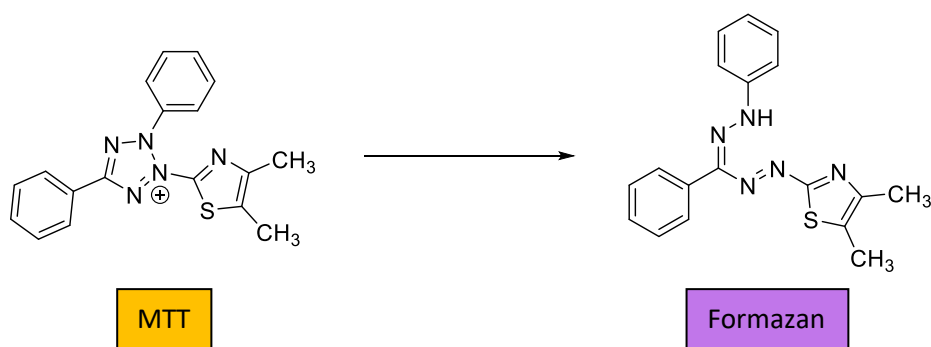


Abb. 46: Enzymatische Umwandlung vom gelb gefärbten MTT zum violett gefärbten Formazan Produkt.

Kolorimetrische Färbemethoden, wie der MTT-Test, lösten die konventionellen radioaktiven Techniken, wie Inkorporation von radioaktiv markierten Thymidin zur Bestimmung der DNA-Synthese oder radioaktiven Chrom zur Bestimmung der Zytotoxizität, ab. [170] Besonders der Sicherheitsaspekt, die einfachere Handhabung und schnellere Durchführung großer Versuchsansätze standen hier in der Entwicklung im Vordergrund und machen den Vorteil des MTT-Tests gegenüber radioaktiven Methoden aus. [171] Da bei der abgebildeten Reaktion (Abb. 46) ein ungeladenes und damit nicht wasserlösliches Formazan-Produkt gebildet wird, wurde der Assay weiterentwickelt, um die quantitative Bestimmung des gebildeten Formazan Produktes einfacher zu gestalten. Bei der Methode wird auf das Edukt XTT (Triphenyltetrazoliumchlorid) zurückgegriffen, welches ein wasserlösliches Formazan bildet. Dieses muss für die quantitative Bestimmung nicht zusätzlich in Lösung gebracht werden. [172]

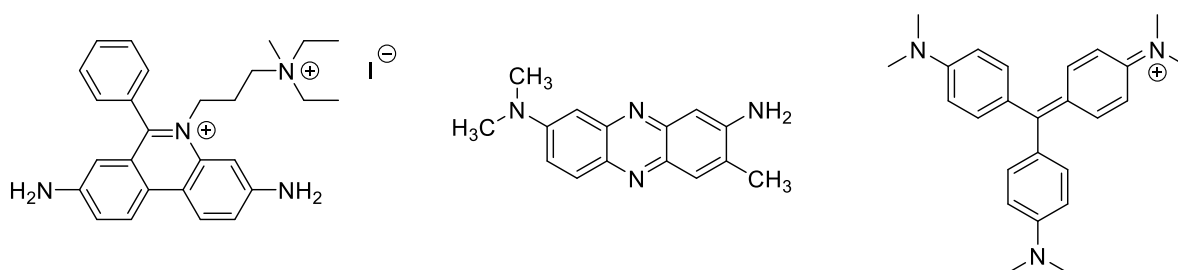


Abb. 47: Mögliche Farbstoffe für kolorimetrische Messungen der Zellviabilität: Propidiumiodid, Neutralrot und Kristallviolett.

Es gibt noch weitere kolorimetrische Methoden, die zur Bestimmung der Zellviabilität geeignet sind: Neutralrot (siehe Abb. 47) färbt in intakten Zellen die intrazytoplasmischen Vakuolen an und bindet an Lysosomen, wodurch ein günstigeres und sensitiveres Verfahren als der MTT-Test etabliert wurde. [173,174] Weitere geeignete Farbstoffe sind Methylenblau, Commassie Blue und Kristallviolett (siehe Abb. 47). [175] Letzteres färbt DNA-assoziierte Nukleoproteine in intakten Zellen an. Diese Technik, die von Gillies et al. 1986 zum ersten Mal beschrieben wurde, stellt damit im Vergleich zum indirekten MTT-Test eine direkte Messmethode dar, bei der keine enzymatischen Prozesse zugrunde liegen. [165,176] Dies macht den großen Vorteil des Kristallviolettassays gegenüber dem MTT-Test aus. Die Noxen der getesteten Substanzen können unterschiedlich auf die mitochondrialen Enzyme wirken, wodurch die Ergebnisse des MTT-Tests verfälscht werden können. [177] Dieses Risiko entfällt für den Kristallviolett-Test. Darüber hinaus muss die Absorptionsmessung nicht schnell und nicht für jeden Inkubationsansatz separat erfolgen, wodurch die Handhabung stark vereinfacht wird. Die Zellplatten können über einen längeren Zeitraum gelagert werden. So ist es beim Kristallviolett-Test möglich, die Absorptionen der t₀-Platte, die die Biomasse zu Beginn der Messung darstellt, zeitnah mit den eigentlichen Zellplatten nach der Inkubationszeit zu vermessen. Die Werte werden anschließend in die

Berechnung des IC_{50} -Wertes mit einbezogen, wodurch gezielt das Wachstum über die Zeit bestimmt und damit die proliferativen Effekte aufgedeckt werden können.

Die folgenden Daten basieren auf der Messung der Zellviabilität mithilfe des Triphenylmethanfarbstoffes Kristallviolett. [178] Die synthetisierten Substanzen wurden an drei verschiedenen Krebszelllinien getestet: HT-29 (humane kolorektale-Adenokarzinomzellen), MCF-7 (humane hormonabhängige Brustadenokarzinomzellen) und MDA-MB-231 (humane hormon-unabhängige Brustadenokarzinomzellen). Eine selektive Wirkung von Zytostatika an Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen wird gefordert, um unerwünschte Wirkungen möglichst gering zu halten. [179] Deshalb wurden die Substanzen darüber hinaus an der humanen Nierenzelllinie RC-124 getestet.

Im Folgenden werden nicht nur die Ergebnisse der Metallkomplexe vorgestellt. Um darüber hinaus Aussagen über die Wirkungsweise von Metall und Ligand im Vergleich treffen zu können, werden auch die Resultate der (Benz-)Imidazoliumhalogenide, der entsprechenden (Benz-)Imidazole und der Ruthenium-Dimere präsentiert, die als Vorstufen der Komplexe dienen.

4.1.1 Zellviabilität der Vorstufen

Substanz	Substituent	Grundkörper	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
1a	-H	Belm	>100	>100	>100	>100
1b	-CH ₃	Belm	>100	>100	>100	>100
1c	-OCH ₃	Belm	>100	>100	>100	>100
1d	-F	Belm	>100	>100	>100	>100
1e	-Cl	Belm	>100	>100	>100	>100
1f	-Br	Belm	>100	26,0 ^{±4,2}	>100	>100
1g	-H	Im	>100	>100	>100	>100
1h	-Br	Im	>100	>100	>100	>100
[(p-Cym)RuCl₂]₂	-	-	>100	>100	>100	>100
[(p-Cym)RuBr₂]₂	-	-	>100	>100	>100	>100
[(p-Cym)RuI₂]₂	-	-	>100	>100	>100	>100

Tab. 7: IC_{50} -Werte der getesteten Vorstufen in μM (n = 4).

Bis auf **1e** zeigen alle (Benz-)Imidazole keine Aktivität an den getesteten Zelllinien mit IC_{50} -Werten $> 100 \mu M$. Auch die als Ausgangsmaterial für die Synthese der Metallkomplexe eingesetzten Ruthenium-Dimere besitzen keine antiproliferativen Eigenschaften. Auffallend ist das Ergebnis von **1e** an der MCF-7 Zelllinie: mit einem IC_{50} -Wert von ca. $26 \mu M$ weist das 5-Brombenzimidazol **1e** eine moderate Aktivität im mikromolaren Bereich auf. Hingegen ist das 4-Bromimidazol **1h** wieder inaktiv. Eine fundierte Erklärung konnte dafür bisher nicht gefunden werden. Da der Bromsubstituent eine größere Lipophilie als die anderen Halogen-Substituenten besitzt, könnte das eine größere Zellaufnahme und damit verbundene antiproliferative Aktivität an der Zelllinie erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass 5-Brombenzimidazol nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip genau mit einem aktiven Zentrum eines möglichen Targets in MCF-7 Zellen interagieren kann. Dabei handelt es sich allerdings nur um Mutmaßungen.

4.1.2 Zellviabilität der Substanzen mit Substitution in der 5-Position des Benzimidazols

Substanz	Substituent	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
2a	-H	$13,5^{\pm 1,7}$	$10,9^{\pm 0,1}$	$23,6^{\pm 1,9}$	$30,1^{\pm 1,1}$
2b	-CH ₃	$4,7^{\pm 0,5}$	$3,7^{\pm 0,4}$	$8,5^{\pm 0,6}$	$8,4^{\pm 1,1}$
2c	-OCH ₃	$8,7^{\pm 1,0}$	$6,0^{\pm 0,7}$	$12,2^{\pm 2,3}$	$8,5^{\pm 2,0}$
2d	-F	$52,8^{\pm 6,5}$	$39,7^{\pm 4,9}$	$73,8^{\pm 11,4}$	$13,1^{\pm 3,3}$
2e	-Cl	$9,3^{\pm 1,6}$	$4,5^{\pm 0,6}$	$21,1^{\pm 3,4}$	$5,8^{\pm 1,0}$
2f	-Br	$62,7^{\pm 4,0}$	$60,9^{\pm 7,7}$	>100	$55,0^{\pm 5,8}$
3a	-H	$9,7^{\pm 0,8}$	$6,3^{\pm 0,9}$	$10,3^{\pm 1,1}$	$24,4^{\pm 4,6}$
3b	-CH ₃	$4,9^{\pm 0,6}$	$3,7^{\pm 0,3}$	$5,6^{\pm 0,6}$	$6,2^{\pm 1,1}$
3c	-OCH ₃	$12,1^{\pm 1,7}$	$8,2^{\pm 0,9}$	$12,9^{\pm 2,2}$	$13,9^{\pm 2,5}$
3d	-F	$12,4^{\pm 1,3}$	$11,5^{\pm 1,6}$	$10,3^{\pm 0,8}$	$15,1^{\pm 1,3}$
3e	-Cl	$5,4^{\pm 0,3}$	$5,9^{\pm 0,9}$	$6,6^{\pm 1,8}$	$9,1^{\pm 1,7}$
3f	-Br	$3,9^{\pm 0,2}$	$4,3^{\pm 0,6}$	$5,3^{\pm 0,3}$	$5,7^{\pm 0,0}$

Tab. 8: IC_{50} -Werte der getesteten Benzimidazoliumbromide **2a-f** und der entsprechenden Ruthenium(II)-NHC-Komplexe **3a-f** in μM ($n = 4$).

Ersichtlich ist, dass auch die Benzimidazoliumbromide eine deutliche Aktivität mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich aufzeigen. Der Aktivitätssteigerung vom Liganden zum jeweiligen

Metallkomplex ist bei allen Substanzen gering (**2a/3a**, **2e/3e**), bzw. gar nicht vorhanden (**2c/3c**, **2b/3b**). Ausnahme stellen hierbei die Substanzen mit Fluor- und Bromsubstituent dar, bei der eine deutliche Aktivitätssteigerung von Ligand **2d**, bzw. **2f** zum Komplex **3d**, bzw. **3f** zu erkennen ist.

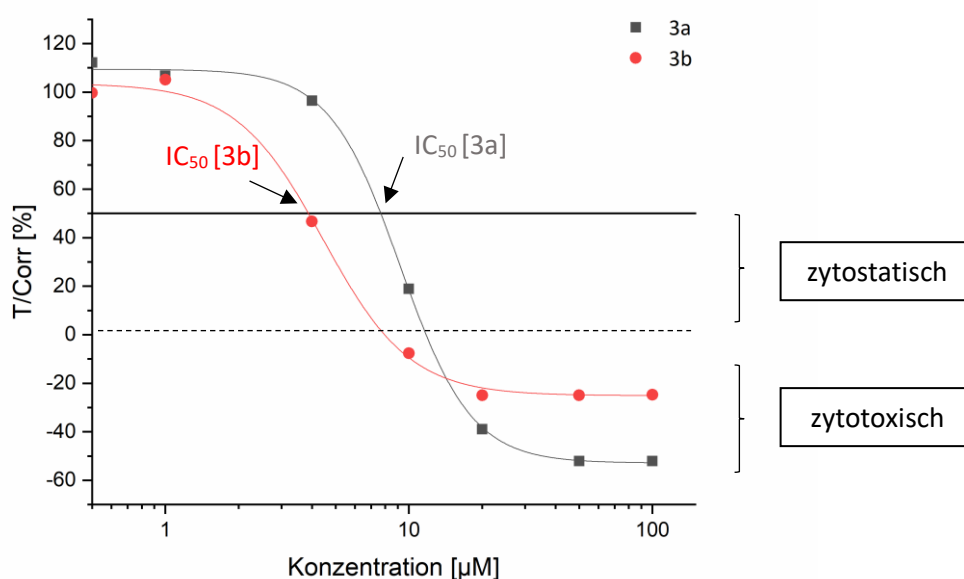
Die aktivste Verbindung stellt die methylierte Variante **2b** bei den Liganden und bei den Komplexen **3b** und **3e** dar. Innerhalb der in der 5-Position des Benzimidazols halogenierten Komplexe lässt sich ein Aktivitätsabfall von **3d** > **3e** ≥ **3f** erkennen.

Sowohl die Benzimidazoliumbromide, als auch die Rutheniumkomplexe zeigen antiproliferatives Effekte an RC-124 Zellen mit IC₅₀-Werten im selben unteren mikromolaren Bereich wie auch an den Krebszelllinien. Die Substanzen weisen damit keine Selektivität an Krebszellen auf. Nur Komplex **3a** zeigt eine halb so große Aktivität an der nicht-karzinogenen Zelllinie. Da der Aktivitätsunterschied gering ist, könnte man diesen höchstens als eine Tendenz definieren, aber nicht als Selektivität.

Die niedrigsten IC₅₀-Werte konnten an MCF-7 Zellen erreicht werden, weshalb diese für weitere biologische Testmethoden ausgewählt wurden.

Die IC₅₀-Werte lassen sich graphisch darstellen, indem man die T/Corr-Werte gegen die getestete Substanzkonzentration graphisch darstellt. Die T/Corr-Werte stellen die gemessene Zellzahl dar, die um die Werte der Kontrolle (gewachsene Zellmasse über die Zeit ohne Substanzbehandlung) korrigiert wurden. Die genaue Berechnung ist in Kapitel 8.8.4 ausführlich erläutert.

Im Folgenden sind im Vergleich die Dosis-Wirkungskurven der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe **3a** und **3b** exemplarisch dargestellt (siehe Abb. 48). An dem Diagramm lassen sich bei 50 % nicht nur die jeweiligen IC₅₀-Werte ablesen, sondern es wird auch ersichtlich, dass der T/Corr-Wert negative Werte einnimmt. Dies zeigt, dass die Zellmasse am Ende der Versuchsreihe eine geringere Zahl aufweist, als zu Beginn der Messung. Damit üben die Substanzen nicht nur einen zytostatischen, sondern einen zytotoxischen Effekt auf die MCF-7 Zellen aus. Dieser Effekt ist bei der Substanz **3a** noch deutlicher ausgeprägt, auch wenn der IC₅₀-Wert etwas höher liegt als bei Substanz **3b**.

Abb. 48: Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung der IC_{50} -Werte von **3a** und **3b** im Vergleich.

4.1.3 Zellviabilität der Imidazolderivate

Substanz	Substituent	Seitenkette	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
2g	-H	-Bn	>100	54,6 \pm 13,8	>100	>100
2h	-Br	-Bn	35,5 \pm 6,5	25,2 \pm 2,0	66,5 \pm 8,5	28,8 \pm 4,1
2i	-H	-Mes	1,5 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,3	2,6 \pm 0,4
3g	-H	-Bn	>100	>100	>100	>100
3h	-Br	-Bn	26,8 \pm 2,0	24,3 \pm 1,7	22,8 \pm 3,3	29,0 \pm 5,2
3i	-H	-Mes	6,3 \pm 1,3	4,3 \pm 0,9	5,6 \pm 2,4	13,6 \pm 1,7

Tab. 9: IC_{50} -Werte der getesteten Imidazolliganden **2g-2i** und der Imidazolkomplexe **3g-3i** in μ M ($n = 4$).

Führt man sich die IC_{50} -Werte der Imidazolderivate vor Augen, sind deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Substanzen zu erkennen. Das benzylierte Imidazol **2g** zeigt keine Aktivität an HT-29, MDA-MB-231 und RC-124 Zellen, weist jedoch einen IC_{50} -Wert von ca. 55 μ M an MCF-7 Zellen auf. Der korrespondierende Ruthenium-NHC-Komplex **3g** ist hingegen an allen Zellen inaktiv. Die bromierte Variante **2h** bringt an allen Zelllinien eine moderate Aktivität von 25 μ M an MCF-7 und von 67 μ M an

MDA-MB-231-Zellen hervor. Aktivitätsunterschiede zum Komplex **3h** sind hingegen kaum vorhanden. Beide zeigen eine Aktivität an RC-124 Zellen, wodurch auch diese Substanzen nicht selektiv an Tumorzellen wirken. Es kann an HT-29 und MDA-MB-231 Zellen eine leichte, im Vergleich zu dem unsubstituierten Komplex **3g** eine deutliche Aktivitätserhöhung erreicht werden. Die niedrigsten IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich werden mit Imidazolderivaten **2i** und **3i** mit Mesitylenseitenkette an den Stickstoffen erzielt. Dabei weist der Ligand **2i** eine noch höhere Aktivität an allen Zelllinien, inklusive der RC-124 Zellen, auf als der entsprechende Komplex **3i**. Dieser weist nur eine halb so große Aktivität an der nicht kanzerogenen Zelllinie RC-124 auf.

4.1.4 Zellviabilität der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden

Die Leitstruktur **3a** wurde in einer Kooperation mit Prof. Dr. Christian Hartinger der University of Auckland um weitere strukturelle Modifikationen ergänzt.

Substanz	Substituent	Seitenkette	Halogenido-Ligand	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
3a	-H	-Bn, -Bn	-Cl	9,7 ^{±0,8}	6,3 ^{±0,9}	10,3 ^{±1,1}	24,4 ^{±4,6}
3a_{Br}	-H	-Bn, -Bn	-Br	12,7 ^{±0,5}	9,4 ^{±2,2}	10,5 ^{±0,2}	n.b.
3a_I	-H	-Bn, -Bn	-I	14,3 ^{±0,7}	8,3 ^{±0,8}	10,6 ^{±0,2}	n.b.
3b	-CH ₃	-Bn, -Bn	-Cl	4,9 ^{±0,6}	3,7 ^{±0,3}	5,6 ^{±0,6}	6,2 ^{±1,1}
3b_{Br}	-CH ₃	-Bn, -Bn	-Br	7,7 ^{±1,6}	6,8 ^{±2,3}	5,4 ^{±1,2}	5,4 ^{±1,2}
3b_I	-CH ₃	-Bn, -Bn	-I	7,2 ^{±1,4}	8,4 ^{±1,7}	5,0 ^{±0,1}	5,0 ^{±0,1}
3a_{Cl}-Me	-H	-Me, -Me	-Cl	>100	>100	>100	n.b.
3a_{Br}-Me	-H	-Me, -Me	-Br	>100	>100	>100	n.b.
3a_I-Me	-H	-Me, -Me	-I	>100	>100	>100	n.b.
3a_{Cl}-MeBn	-H	-Me, -Bn	-Cl	>100	79,7 ^{±18}	88,6 ^{±11}	n.b.
3a_{Br}-MeBn	-H	-Me, -Bn	-Br	42,9 ^{±8,9}	33,9 ^{±4,0}	27,8 ^{±4,2}	n.b.

Tab. 10: IC₅₀-Werte der getesteten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden in μM (n = 4, Ausnahme stellt Substanz **3a_{Cl}-MeBn** dar, die aufgrund geringer Substanzmenge nur zweimal getestet werden konnte, wodurch sich die großen Standardfehler ergeben, n.b. = nicht bestimmt).

Auffallend ist, dass die am Stickstoff methylierten Komplexe (**3a_{Cl}-Me**, **3a_{Br}-Me**, **3a_I-Me**) mit IC₅₀-Werten >100 µM keine proliferationshemmenden Eigenschaften aufzeigen. Bei den gemischt methylierten/benzylierten Komplexen (**3a_{Cl}-MeBn**, **3a_{Br}-MeBn**) konnte die Aktivität der Komplexe gesteigert werden, wobei die Bromido-Komplexe mit ca. 30 µM niedrigere IC₅₀-Werte aufzeigen als die Chlorido-Komplexe mit 80 µM. Die höchste Aktivität konnte mit den benzylierten Verbindungen mit IC₅₀-Werten von ca. 10 µM erreicht werden. Beim Halogenidaustausch der Leitstruktur stellt der Chlorido-Komplex **3a** die aktivste Verbindung dar, die Bromido- und Iodido-Komplexe (**3a_{Br}**, **3a_I**) unterscheiden sich nicht in der Aktivität. Allerdings ist der Unterschied der IC₅₀-Werte in dieser Reihe sehr gering. Auch bei den Komplexen mit Methylsubstituent (**3b**, **3b_{Br}**, **3b_I**) werden ähnliche Ergebnisse erzielt. Die aktivste Verbindung stellt der Chlorido-Komplex **3b** dar, jedoch werden nur geringe Abweichungen zu **3b_{Br}** und **3b_I** erzielt. Zwischen den letzten beiden lässt sich keine Differenz im antiproliferativen Verhalten feststellen. Allerdings können mit der am Benzimidazol-methylierten Substanzreihe (**3b-3b_I**) die IC₅₀-Werte im Vergleich zu den unsubstituierten Komplexen (**3a-3a_I**) nahezu halbiert werden. Dieser Effekt ist vor allem an HT-29 und MDA-MB-231-Zellen erkennbar.

Diese Ergebnisse korrelieren mit vorangegangenen Untersuchungen, die zeigen, dass eine lipophile Seitenkette die Voraussetzung für die notwendige Zytotoxizität darstellt. [126] Bereits durch Einfach-Benzilylierung des Benzimidazolgrundkörpers konnten die proliferationshemmenden Eigenschaften der Komplexe gesteigert werden. Aber erst mit zweifacher Benzilylierung wurden IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich erreicht.

Der Halogenaustausch am Rutheniumkomplex brachte keinen Vorteil im Hinblick auf die antiproliferativen Eigenschaften der Substanzen. Die Chlorido-Komplexe (**3a**, **3a_{Cl}-Me**, **3a_{Cl}-MeBn** und **3b**) stellen in allen Fällen und an allen getesteten Zelllinien die aktivsten Derivate in ihrer Substanzgruppe dar. Von **3b-3b_I** lassen sich Aktivitäten an RC-124 Zellen im gleichen Ausmaß wie an den karzinogenen Zellen feststellen. Auch diese Substanzreihe wirkt nicht selektiv an den Tumorzellen.

4.1.5 Zellviabilität der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit Pyrithion-Ligand

Im Folgenden sind im Vergleich die Ergebnisse der Ausgangssubstanz Mercaptopyridin-*N*-Oxid (**MPNO**), der daraus gebildete Pyrithion-Rutheniumkomplex **Pth-Ru** und die neuen Ruthenium(II)-NHC-Pyrithion Komplexe **3aPth-Bn** und **3aPth-Me** zum Chlorido-Komplex **3a**, sowie das an den Stickstoffen methylierte Benzimidazoliumiodid **2a-Me** aufgeführt.

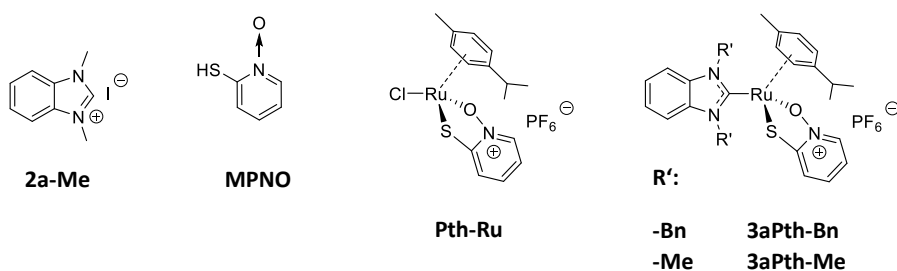


Abb. 49: Strukturen der getesteten Ruthenium(II)-NHC-Pyrrhion-Komplexe und für die Synthese verwendeten Vorstufen.

Substanz	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
2a-Me	>100	>100	>100	>100
MPNO	2,7 ^{±0,9}	0,5 ^{±0,1}	0,7 ^{±0,2}	2,5 ^{±0,2}
Pth-Ru	1,4 ^{±0,1}	0,4 ^{±0,1}	1,9 ^{±0,7}	6,4 ^{±1,1}
3a	9,7 ^{±0,8}	6,3 ^{±0,9}	10,3 ^{±1,1}	24,4 ^{±4,6}
3aPth-Bn	0,6 ^{±0,2}	0,6 ^{±0,2}	0,6 ^{±0,2}	0,4 ^{±0,1}
3aPth-Me	0,9 ^{±0,1}	0,7 ^{±0,1}	1,0 ^{±0,2}	0,9 ^{±0,1}

Tab. 11: IC₅₀-Werte der getesteten Pyrrhion-Komplexe in μM (n = 4).

Es zeigt sich, dass alle schwefelhaltigen Verbindungen deutliche antiproliferative Eigenschaften mit IC₅₀-Werten im unteren mikromolaren Bereich besitzen. Hierbei ist kein Unterschied in der Aktivität zwischen dem Ausgangsmaterial **MPNO**, dem Pyrrhionkomplex **Pth-Ru** und der Pyrrhion-NHC-Ru Komplexen **3aPth-Bn** und **3aPth-Me** festzustellen. Der Austausch der Chlorido-Liganden **3a** gegen einen Pyrrhionliganden führt zu einer 10-fachen Aktivitätserhöhung mit IC₅₀-Werten von 0,6 / 0,7 μM . Die IC₅₀-Werte der methylierten Variante **3aPth-Me** liegt im gleichen Bereich wie die die IC₅₀-Werte der benzylierten Variante **3aPth-Bn**. Beide zeigen keine Selektivität, da ähnliches Verhalten an RC-124 Zellen auftritt. Die lipophilen Seitenketten scheinen bei dieser Substanzklasse keine Auswirkung mehr auf die Zytotoxizität zu haben.

4.2 Transferrin-vermittelte Proliferationshemmung

Neben dem gängigen Experiment zur Untersuchung der antiproliferativen Effekte konnte eine Methode zur Bestimmung der Transferrin-vermittelten Proliferationshemmung etabliert werden. [180] Hierzu wurde an MCF-7 Zellen die Substanz **3b** unter Zugabe von Apotransferrin (ATF) in unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit von Zugabe und Ausschluss von fetalem Kälberserum (FCS) im Medium untersucht. So ergaben sich folgende Versuchsbedingungen:

Substanz	Zusätze im DMEM-Medium
3b	- FCS
3b	- FCS + ATF
3b	- FCS + 5 ATF
3b	+ FCS + ATF

Tab. 12: Versuchsbedingungen für die Messung der Transferrin-vermittelten Proliferationshemmung.

Normalerweise wird für die Methode zur Bestimmung der Zellviabilität mittels Kristallviolett dem Medium FCS zugesetzt, um ein ausreichendes Zellwachstum zu garantieren. [181] Zunächst war nicht ersichtlich, ob der Test unter den Bedingungen ohne Zusatz von FCS überhaupt funktionieren würde. Fehlendes Zellwachstum aufgrund eines Mangels an Wachstumsfaktoren würde einen niedrigeren IC_{50} -Wert vortäuschen und damit ein falsch positives Ergebnis hervorrufen. Hierzu wurden in einem Vorversuch die Zellplatten unter Zugabe von serumfreiem Medium inkubiert. Die Absorptionen wurden mit einer Zellplatte, die FCS-haltiges Medium enthielt, verglichen. Die Absorptionswerte lagen niedriger als die der mit FCS behandelten Platte, da weniger Zellmasse auf den Platten vorhanden war. Die Zellzahl war dennoch hoch genug, um eine Abnahme der Absorptionen unter Substanzbehandlung ermitteln zu können. Der IC_{50} -Wert stellt einen relativen Wert dar, da die höchste gemessene Absorption bei kleinster Substanzkonzentration als 100 % gesetzt wird. So konnte der IC_{50} -Wert auch unter Ausschluss von FCS problemlos ermittelt werden. Als Kontrolle diente dennoch die Zugabe von ATF zu FCS-haltigem Medium unter Substanzzugabe auf die Zellplatte. Die Apotransferrinkonzentration wurde aufgrund der verwendeten Substanzkonzentration für die Zellaufnahmestudien (siehe Kapitel 5.7) ausgewählt. Da die Messungen von **3b** bei 5 μ M erfolgten, wurde im Kristallvioletttest eine fixe Konzentration von 5 μ M (äquimolare Menge ATF = ATF), bzw. eine fünffach höhere Konzentration von 25 μ M (fünffache Menge ATF = 5 ATF) verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 13 aufgeführt. Als Vergleich dient der IC_{50} -Wert von **3b** unter normalen Bedingungen (Zusatz von FCS zum Medium).

Substanz	Zusätze im DMEM-Medium	IC_{50} [μ M]
3b	+ FCS	3,7 $^{\pm 0,3}$
3b	- FCS	3,6 $^{\pm 0,3}$
3b	- FCS + ATF	0,5 $^{\pm 0,2}$
3b	- FCS + 5 ATF	2,2 $^{\pm 1,7}$
3b	+ FCS + ATF	6,5 $^{\pm 0,5}$

Tab. 13: Ergebnisse der Transferrin-vermittelten Proliferationshemmungen an MCF-7 Zellen, dargestellt als IC_{50} -Werte der getesteten Verbindung in μ M (n = 3).

Zwischen dem Zusatz zum Medium und Ausschluss von FCS ist kein Unterschied im IC_{50} -Wert zu verzeichnen. Allerdings hat die Zugabe von ATF zum Medium eine deutliche Aktivitätssteigerung zur Folge. Vor allem unter der äquimolaren Zugabe von ATF unter FCS-Ausschluss konnte ein IC_{50} -Wert von $0,5 \mu M$ gemessen werden, welcher im Vergleich zur normalen Durchführung mit einem IC_{50} -Wert von ca. $4 \mu M$ eine 8-fach höhere Aktivität darstellt. Die fünffache Menge an ATF hat einen geringeren Einfluss und kann die Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von ca. $2 \mu M$ nicht signifikant steigern. Eventuell kommt es zu einer Sättigung, sodass durch eine Erhöhung der ATF-Konzentration kein weiterer Effekt auf die Zellviabilität erreicht wird. Der Zusatz von ATF zu FCS-haltigen Medium führt jedoch zu einer Abnahme der proliferierenden Eigenschaften, was in einem IC_{50} -Wert von ca. $7 \mu M$ resultiert. FCS enthält neben Transferrin vor allem Albumin. [181] Eventuell bindet der Komplex bevorzugt an Albumin, wodurch der positive Einfluss von Transferrin auf die Antiproliferation verhindert wird.

4.3 Live-Cell Imaging

Um einen genaueren Eindruck über die antiproliferativen Eigenschaften der Substanzen auf die Krebszelllinien zu erhalten, wurde eine Videomikroskopanalyse durchgeführt. Hierzu wurden MCF-7 Zellen mit den Substanzen **3a** und **3b** in einer Konzentration von $5 \mu M$, bzw. DMF als Kontrolle über 96 h inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde die Konfluenz des Zellrasens (in Prozent) gemessen, welche der Zeit graphisch gegenübergestellt abgebildet werden kann. (siehe Abb. 50)

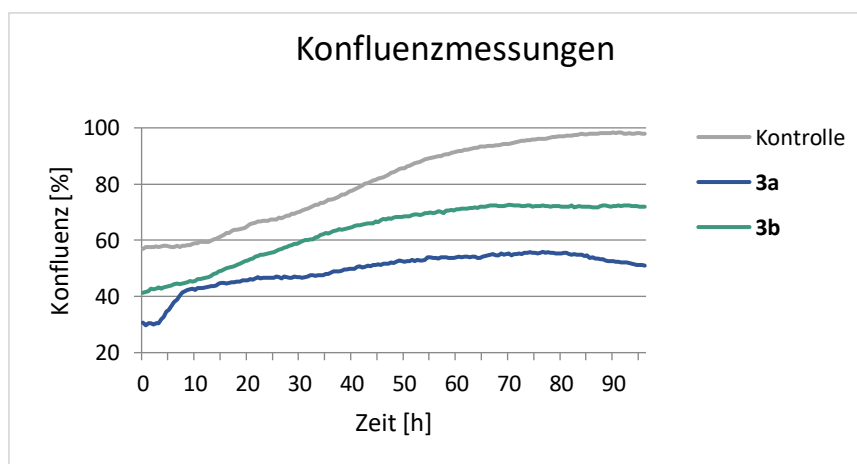


Abb. 50: Konfluenzmessung (in %) von MCF-7 Zellen über 96 h unter Behandlung von **3a** [$5 \mu M$] und **3b** [$5 \mu M$] im Vergleich zur Kontrolle DMF (0,1 % V/V) an MCF-7 Zellen.

Da aufgrund technischer Gegebenheiten nur zwei Proben zur gleichen Zeit parallel gemessen werden können, wurden die Komplexe **3a** und **3b** in zwei unabhängigen Messansätzen jeweils gegen eine Kontrolle getestet, auch wenn in der Abb. 50 nur eine Kontrolle abgebildet ist. Dadurch ergeben sich

auch die unterschiedlichen Startkonfluenzen, die bei der Kontrolle mit ca. 60 % deutlich höher liegt als bei den Komplexen **3a** und **3b** mit 30-40 %. Darüber hinaus ist es in der Zellkultur kaum realisierbar, die exakt gleichen Startbedingungen in Bezug auf die Zellzahl zu erreichen. Dennoch lässt sich bei allen drei Wachstumskurven zunächst ein Anstieg der Konfluenz erkennen. Die Zellen der Kontrolle zeigen nach ca. 15 h bis ca. 60 h einen linearen Wachstumsverlauf, der ab ca. 90 h Inkubationszeit ein Plateau erreicht. Zeitgleich wird bereits eine Konfluenz von knapp 100 % erreicht. Der Zellrasen ist damit über die ganze Zellflasche verteilt und abgesättigt. Dadurch kann es dazu kommen, dass die ersten Zellen aufgrund des Verbrauches an Medium, der Entstehung toxischer Stoffwechselprodukte oder Absinken des pH-Wertes im Medium bereits absterben.

Auch bei Komplex **3b** ist bis ca. 35 h ein linearer Wachstumsverlauf zu verzeichnen, bei Komplex **3a** ist er in den ersten 5 h der Inkubationszeit am stärksten ausgeprägt. Danach steigt die Konfluenz nur noch gering an. Bei Komplex **3a** sinkt die Konfluenz nach ca. 80 h von 55 % auf 50 % ab, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet. Das gleiche Phänomen lässt sich bei Substanz **3b** ab 95 h nur erahnen. Dennoch wird bei beiden Substanzen keine höhere Konfluenz als ca. 70 % erreicht. Damit besitzen beide Komplexe Auswirkungen auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen. Diese Auswirkung wird erst nach einigen Stunden bemerkbar: bei Komplex **3a** nach ca. 10 h, bei Komplex **3b** nach ca. 45 h. Dabei könnte es sich um die Zeit handeln, die die Rutheniumkomplexe benötigen, um in den Zellen zu akkumulieren oder mit der Zellmembran zu interagieren. Erst wenn die Interaktion mit möglichen Zieltargets und Auslösung von Mechanismen in der Zelle stattgefunden haben, sind Auswirkungen auf die proliferierenden Eigenschaften der Zellen zu verzeichnen. Komplex **3a** scheint hierbei einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen auszuüben, da sich die Zellzahl zum Ende der Inkubationszeit wieder verringert. Dieses Ergebnis korreliert mit der aufgezeichneten Dosis-Wirkungs-Kurve in Abb. 48, Kapitel 4.2.

Dieses Experiment stellt nicht nur eine Methode zur Messung der Konfluenz dar, sondern die Zellen können auch über die Zeit über die entstandenen Fotos nach Form, Größe und morphologischen Unterschieden beurteilt werden. Im Folgenden werden exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der MCF-7 Zellen unter Behandlung von DMF (Kontrolle), **3a** und **3b** nach 10 h, bzw. 96 h Inkubationszeit abgebildet:

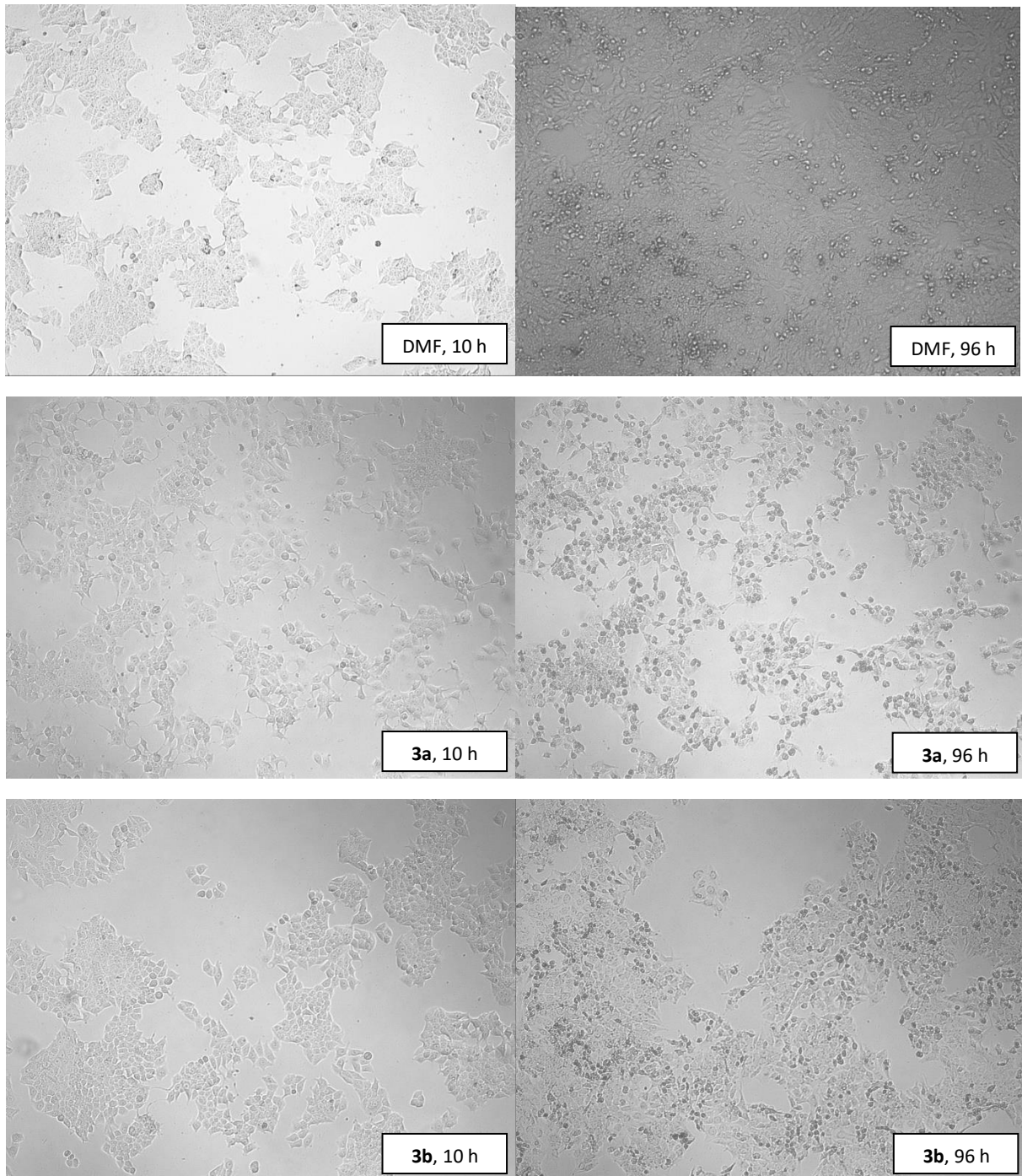


Abb. 51: Mikroskopische Aufnahmen, angefertigt mit Juli™Br (96-fache Vergrößerung), MCF-7 Zellen versetzt mit: 1. Reihe DMF (0,1 % V/V) nach 10 h und 96 h Inkubationszeit; 2. Reihe **3a** [5 μM] nach 10 h und 96 h Inkubationszeit und 3. Reihe **3b** [5 μM] nach 10 h und 96 h Inkubationszeit.

Bei der Kontrolle erkennt man, dass sich Zell-Zellkontakte über die Zeit ausgebildet haben und sich damit der Zellrasen über die 96 h Inkubationszeit über die gesamte Fläche erstreckt. In der Aufnahme nach 10 h sind vereinzelt kugelförmige Zellen zu erkennen, jedoch wurde in den darauffolgenden Aufnahmen ersichtlich, dass es sich um Momentaufnahmen von sich teilenden Zellen handelt.

Bei den Komplexen **3a** und **3b** breitet sich der Zellrasen nach 96 h nicht über die ganze Fläche aus, die Substanzen üben einen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zellen aus. Zudem haben sich deutlich kugelförmige Zellen gebildet, die kleiner erscheinen als die übrigen Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle handelt es sich nicht um sich teilende Zellen. Es scheint, als hätten die Zellen ihre Zell-Zellkontakte zu Nachbarzellen gelöst, das Ausbilden dieser Kontakte reduziert und sich vom gesamten Zellrasen gelöst. Aussagen über die Auswirkung auf die Morphologie der Zellen unter Substanzeinwirkung, oder dem Verhalten, wie Eintreten der Zelllyse, lassen sich durch diese Aufnahmen nicht treffen, da die Auflösung der Aufnahmen zu gering ist. Jedoch lässt die deutlich kleinere und kugelförmige Form der Zelle darauf schließen, dass diese bereits abgestorben ist, bzw. die Apoptose eingeleitet wurde. Die Apoptose äußert sich morphologisch genau mit solchen Eigenschaften. [100] Die kugelförmigen Zellen lassen sich vereinzelt auch nach 96 h Inkubation bei der Kontrollaufnahme verzeichnen. Hierfür lässt sich, wie oben bereits erwähnt, der Mangel an frischem Medium und Konkurrenz der Zellen untereinander verantwortlich machen.

4.4 Untersuchung des Apoptoseverhaltens

Die folgenden Versuche wurden von Dr. Dr. Aram Prokop und Nicola Wilke der Forschergruppe „Experimentelle Onkologie“ des Kinderkrankenhauses Köln, Amsterdamer Straße 59, 50735 Köln, durchgeführt.

Zytostatika sollen maligne Zellen eliminieren und unschädlich machen. Sie können dabei unterschiedliche zelluläre Angriffspunkte haben, wobei die Auslösung der Apoptose einen möglichen Wirkmechanismus darstellt.

Um ein potenzielles Verhalten der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe auf die Induzierung von Apoptosemechanismen der Zellen genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt. Dafür standen verschiedenen Zelllinien zur Verfügung. Zum einen wurde die Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane leukämische B-Vorläufer Zellen. [182] Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der die Lymphozyten sich unkontrolliert vermehren. [183] Bei der B-ALL-Form sind vor allem die B-Vorläuferzellen betroffen. Die Erkrankung stellt eine der häufigsten Krebserkrankungen im Kinder- und Jugendalter dar. [184,185]

Die gängigste Therapie der ALL bildet die Wirkstoffkombination Vincristin und Dexamethason. [186] Da Resistenzentwicklung bei Krebsarten ein immer größer werdendes Problem darstellt, wurden die Versuche auch an resistenten Nalm-6 Zellen durchgeführt: NVCR (Resistenz gegen Vincristin), NDauno

(Resistenz gegen Daunorubicin), Mako (Resistenz gegen Cytarabin) und Naku (Resistenz gegen Prednison und Dexamethason). [93,187] Darüber hinaus wurde die lymphatische BJAB mock Zelllinie (Burkitt like) verwendet. Ein Burkitt-Lymphom gehört zur Gruppe der B-Zell-Non Hodgkin Lymphome, welches nach dem Entdecker Dr. Denis Burkitt benannt worden ist. [188] Auch von dieser Zelllinie existieren resistente Formen: Die Bibo-Zelllinie, welche eine Resistenz gegen Vincristin aufweist und 7-CCA mit einer ausgebildeten Resistenz gegen Doxorubicin. [187] Die resistenten Zelllinien wurden dabei mit den entsprechenden Wirkstoffen über einen längeren Zeitraum behandelt, sodass sich die Resistenzen ausgebildet haben. [187] Bei Vincristin handelt es sich um einen Mitosehemmstoff, der die Zellteilung in der Metaphase inhibiert, indem der Aufbau der Kernspindel gehemmt wird. [88] Dauno- und Doxorubicin gehören zur Klasse der Anthracycline, welche ihre Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus entfalten. Sie interkalieren nicht nur in die DNA, sondern hemmen auch die Topoisomerase II, wodurch es zu Strangabbrüchen kommt. [88] Cytarabin wird als Cytidin-Nukleosid als Antimetabolit in die DNA eingebaut, wodurch eine Hemmung der Replikation erreicht wird. [88]

4.4.1 Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen

Die Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen wurde sowohl für die Liganden **2a** und **2b** als auch die korrespondierenden Komplexe **3a** und **3b** untersucht. Die Ergebnisse des Liganden sind der des jeweiligen Komplexes graphisch gegenübergestellt. Die Kontrolle K0 stellt hierbei die Anzahl apoptotischer Zellen dar, die auch ohne Substanzeinwirkung von außen über die Inkubationszeit gebildet wird. Dieser Wert wurde von den ermittelten apoptotischen Zellen unter Substanzbehandlung subtrahiert. Außerdem sind als Kontrolle die apoptotischen Zellen unter Einwirkung des verwendeten Lösemittels DMSO aufgeführt. Bei dem Versuch werden die Zellen mit den Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen über 72 h inkubiert, wodurch möglicherweise die Apoptose der Zellen induziert wird. Durch Einleitung der Apoptose kommt es zur Fragmentierung des Nukleus und damit auch zur DNA. Diese Fragmente lassen sich mittels einer Zellzyklusanalyse detektieren. Dabei wurde die Rate hypodiploider Zellen im Sub-G1 Assay durchflusszytometrisch bestimmt. [127] Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode zur Analyse und Aufbereitung von Einzelzellen in Suspensionen auf Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. [189,190] Über die gemessenen Fragmente kann auf die prozentuale Anzahl apoptotischer Zellen zurück geschlossen werden.

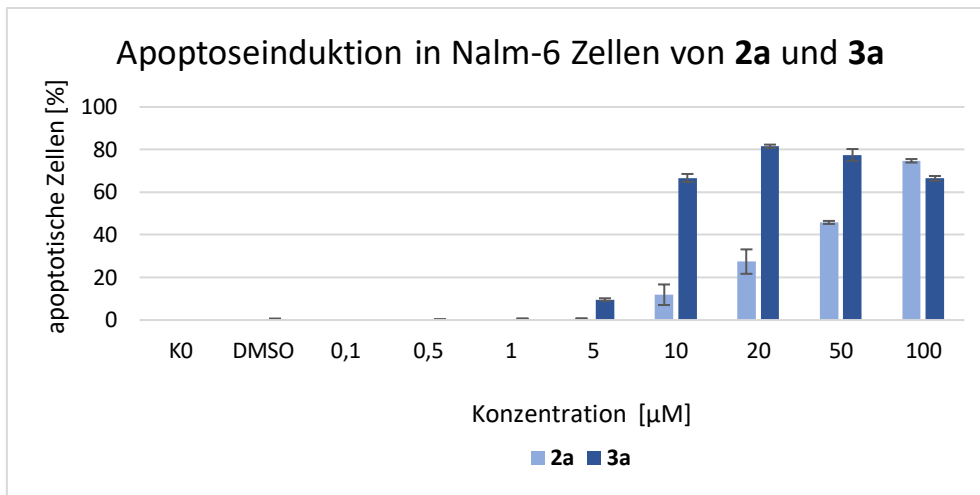


Abb. 52: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2a** und **3a** in Nalm-6 Zellen (n = 3).

Festzustellen ist, dass DMSO keine signifikante Auswirkung auf die Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen besitzt. Hingegen haben sowohl der Ligand **2a** als auch Komplex **3a** einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion. Jedoch ist der Effekt von **3a** deutlich höher ausgeprägt. Bei einer Konzentration von ca. 8 µM wurde der IC_{50} -Wert erreicht. Dieser entspricht allgemein der Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen abgestorben ist, in diesem Fall derjenigen Konzentration, bei der in 50 % der Zellen die Apoptose eingeleitet wurde. Bei **2a** wird der IC_{50} -Wert erst bei einer Konzentration von über 50 µM erreicht.

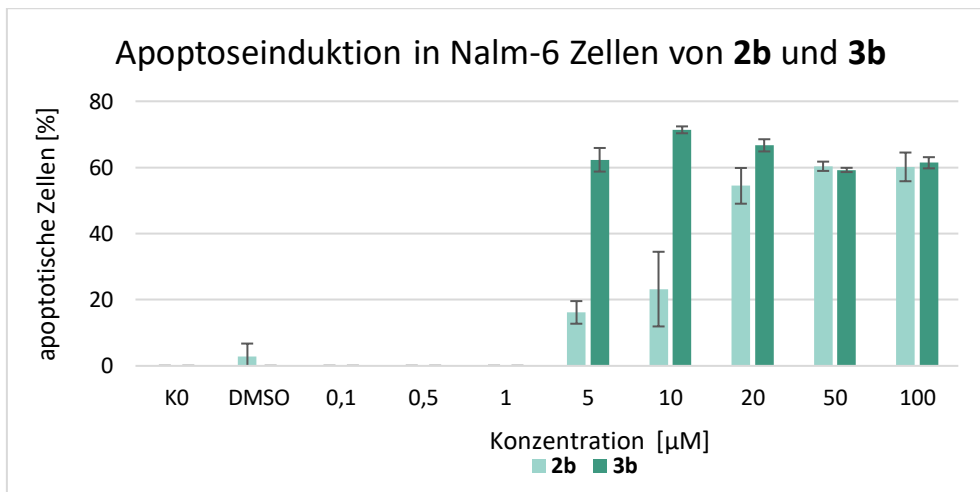


Abb. 53: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2b** und **3b** in Nalm-6 Zellen (n = 3).

Bei Ligand **2b** und Komplex **3b** werden ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei beide Substanzen deutlich größere Auswirkungen auf die Apoptose der Zellen besitzen als die Substanzen **2a** und **3a**. Der

IC₅₀-Wert von **3b** wird schon bei einer Konzentration von ca. 5 μM erreicht, bei **2b** reicht eine Konzentration von ca. 20 μM aus, um die Apoptose in 50 % der Zellen zu induzieren.

4.4.2 Apoptoseinduktion in resistenten Nalm-6 Zellen

Neue Substanzen, die bestehende Resistenzen überwinden können, stellen ein großes Ziel in der Wirkstofffindung dar. Das gilt auch in Hinblick auf die Entwicklung von neuen Kombinationstherapien. Deshalb wurde der unter 4.4.1 vorgestellte Versuch mit Ligand **2b** und Komplex **3b** an den Nalm-6 Zellen wiederholt und darüber hinaus im Vergleich an resistenten Nalm-6 Zelllinien NVCR und NDauno getestet. Als Positivkontrolle an den Zelllinien dienen die Arzneistoffe Vincristin (VCR) und Daunorubicin (Dauno).

Bei der Zelllinie NVCR ist die Resistenz gegen Vincristin auf eine Überexprimierung von P-Glykoprotein (Pgp) zurückzuführen. [128] Das Pgp stellt einen ATP-abhängigen Efflux-Transporter dar. Es handelt sich um ein Phosphoglykoprotein, welches aus zwei ATP-Bindungskassetten und zwei transmembranären Regionen besteht. Es ist in der Lage hydrophobe Stoffe beim Eintreten in die Plasmamembran zu binden. [191] Dazu gehören u.a. auch Doxorubicin und Daunorubicin. Das Pgp stellt ein Produkt des MDR1-Gens dar (MDR = Multidrugresistance) und wird in vielen Krebszelllinien überexprimiert. [191] Es ist eine der häufigsten Resistenzmechanismen bei Krebsarten. [192]

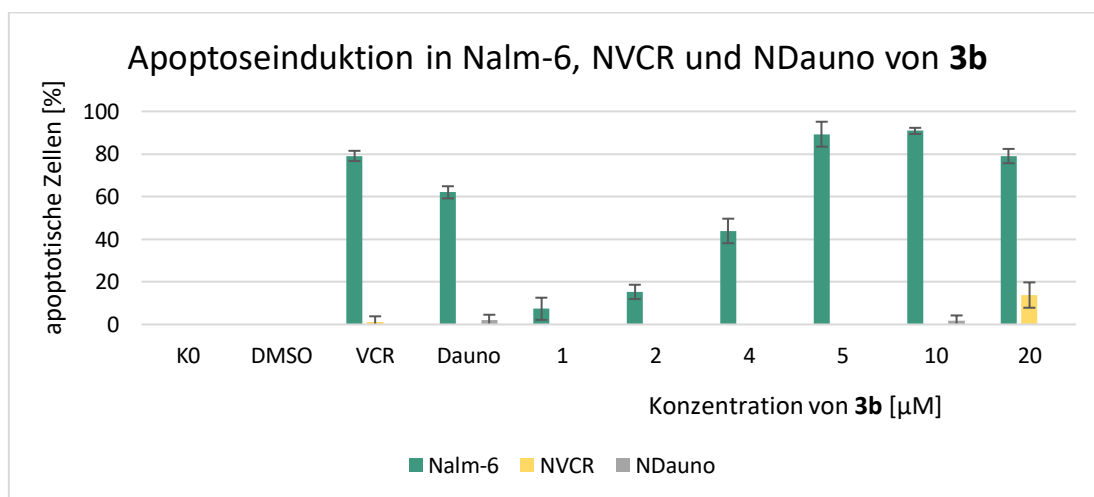


Abb. 54: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in Nalm-6, NVCR und NDauno Zellen (Vergleichssubstanzen: VCR [22,7 nM] und Dauno [56,6 nM], n = 3).

Komplex **3b** zeigt erneut eine Apoptose-Induzierung in Nalm-6 Zellen, jedoch nur eine geringe an den beiden resistenten Zelllinien. Bei einer Konzentration von 20 μM lassen sich 1/10 der NVCR-Zellen zur Apoptose leiten. Dieser Wert spricht nicht signifikant für die Überwindung der Resistenz. Zwar werden

höhere Werte im Gegensatz zum Versuch unter Zugabe von VCR erreicht, jedoch wurde diese in einer Konzentration von 22,7 nM eingesetzt. Dadurch können die Werte nicht verglichen werden. Auch an der getesteten Zelllinie NDauno kann die Resistenz nicht durchbrochen werden. Bei einer Substanzkonzentration von 10 µM werden zwar eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen detektiert, allerdings tritt dieser Effekt bei 20 µM nicht mehr auf.

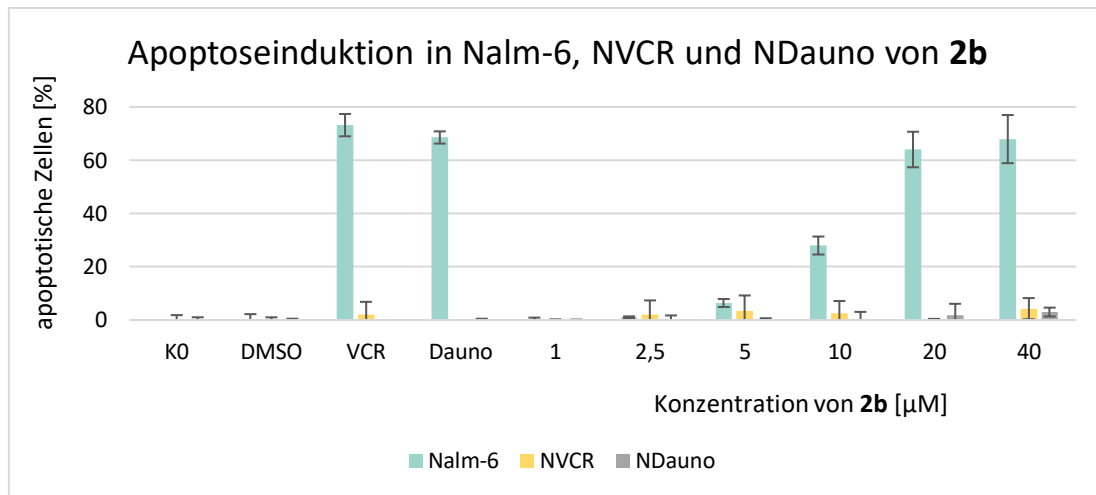


Abb. 55: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2b** in Nalm-6, NVCR und NDauno Zellen (Vergleichssubstanzen: VCR [22,7 nM] und Dauno [56,6 nM], n = 3).

Bei dem Liganden **2b** wird zwar über den ganzen Konzentrationsbereich die Apoptose eingeleitet, jedoch nie über einen Wert von 5 % hinaus. Der Ligand ist also an den resistenten Zellen NVCR und NDauno nicht aktiv. Beide Stoffe, sowohl **2b** als auch **3b**, scheinen Substrate des P-Glykoproteins zu sein.

Weitere Resistenzen der Nalm-6 Zelllinie bestehen gegen Cytarabin und Prednisolon, welche in den Zelllinien Mako, bzw. Naku unter jeweiliger Substanzbehandlung angezüchtet wurden. Auch an diesen Zelllinien wurde sowohl der Ligand **2b** als auch der Komplex **3b** getestet. Als Kontrolle dient die Zugabe von Cytarabin (Ara C) und Prednisolon (Pred.).

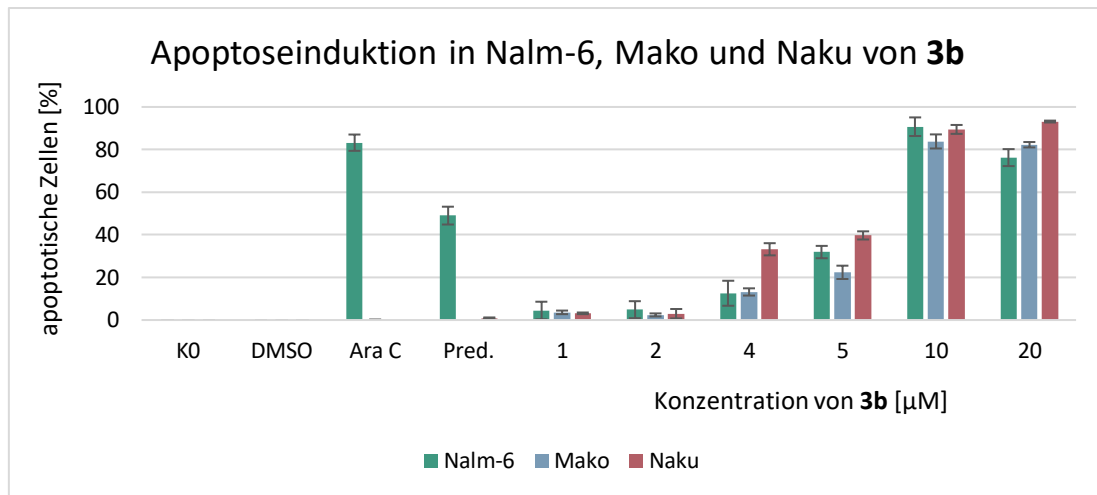


Abb. 56: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in Nalm-6, Mako und Naku Zellen (Vergleichssubstanzen: Cytarabin (Ara C) [1,4 µM] und Prednisolon (Pred.) [55,6 µM], n = 3).

Es wird ersichtlich, dass auch an den resistenten Zelllinien IC_{50} -Werte im gleichen Ausmaß wie an Nalm-6 Zellen erreicht werden. Der IC_{50} -Wert von **3b** beträgt an allen drei Zelllinien ca. 6 µM. Die größte Anzahl apoptotischer Zellen wird an der Glucocorticoid-resistenten Zelllinie Naku erreicht.

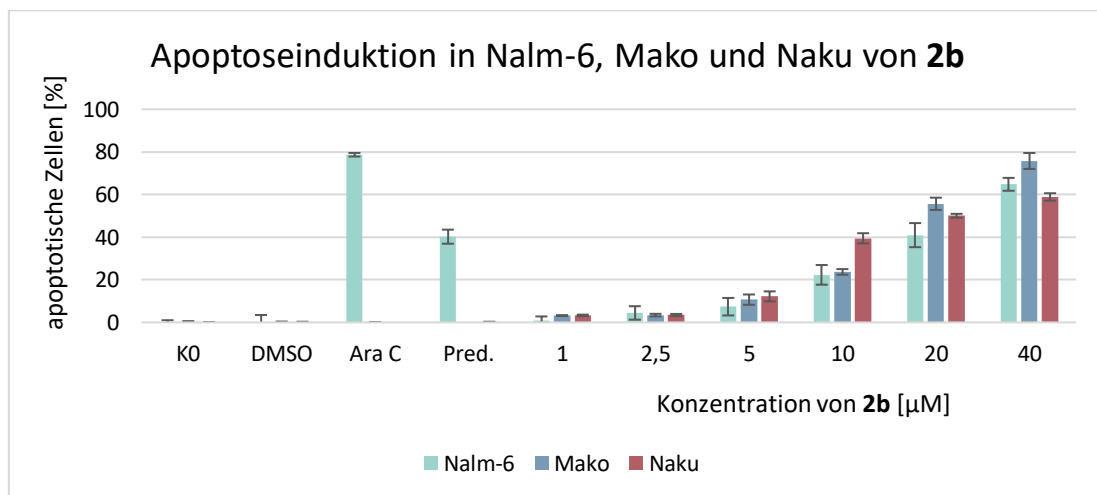


Abb. 57: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2b** in Nalm-6, Mako und Naku Zellen (Vergleichssubstanzen: Cytarabin (Ara C) [1,4 µM] und Prednisolon (Pred.) [55,6 µM], n = 3).

Die IC_{50} -Werte liegen für den Ligand **2b** bei ca. 20 µM an der Mako- und Naku-Zelllinie. Die Kontrolle mit Ara C und Prednisolon zeigt, dass diese Stoffe an den resistenten Zellen keine Auswirkung auf die Apoptose der Zellen haben. Jedoch können die Resistenzen unter Behandlung von **2b** und **3b** erfolgreich durchbrochen werden. Dies spricht dafür, dass in diesem Fall die Resistenz der Zelllinien

nicht P-Glykoprotein vermittelt ist und somit der Ruthenium-NHC-Komplex **3b** einen sinnvollen Zusatz innerhalb dieser Kombinationstherapie darstellen sollte.

4.4.3 Selektivitätsbestimmungen

Die gleiche Versuchsreihe wurde auf zwei weitere Zelllinien ausgedehnt. In den folgenden Ergebnissen ist nicht nur erneut die Apoptoseinduzierung an Nalm-6 Zellen aufgeführt, sondern auch die an der lymphatischen Krebszelllinie BJAB mock. Darüber hinaus wurde das Apoptoseverhalten unter Substanzeinwirkung an humanen Leukozyten, einer nicht kanzerogenen Zelllinie, getestet. Mit dieser Testreihe können Aussagen über die Selektivität der getesteten Substanzen getroffen werden.

Bei **2b** liegt der IC_{50} -Wert mit ca. $9\ \mu M$ in dieser Versuchsreihe wieder etwas niedriger als bei den bisher gezeigten Ergebnissen. Auch an den BJAB mock Zellen lässt sich die Apoptose einleiten. Dabei ist der Ligand an dieser Zelllinie ähnlich aktiv, der IC_{50} -Wert liegt bei ca. $11\ \mu M$. Auffallend ist jedoch, dass bis zu $20\ \mu M$ Substanzkonzentration keine gravierende Apoptoseinduktion in humanen Leukozyten erzielt werden kann. Bei einer eingesetzten Konzentration von $20\ \mu M$ wird lediglich in ca. 6 % der Zellen die Apoptose induziert.

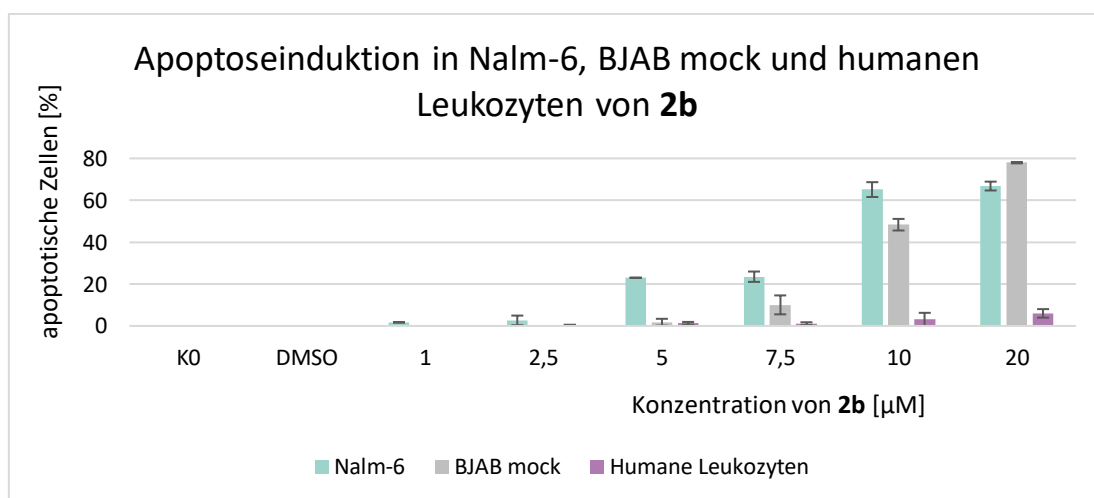


Abb. 58: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2b** in Nalm-6, BJAB mock und humanen Leukozyten ($n = 3$).

Mit dem Rutheniumkomplex **3b** werden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Der IC_{50} -Wert an BJAB mock Zellen liegt mit ca. $10\ \mu M$ etwas höher als an Nalm-6 Zellen mit einem IC_{50} -Wert von ca. $5\ \mu M$. Aber auch in diesem Fall wird keine nennenswerte Apoptoseinduktion in humanen Leukozyten getriggert. Bei einer Substanzkonzentration von $20\ \mu M$ werden nur ca. 9 % apoptotische Zellen detektiert.

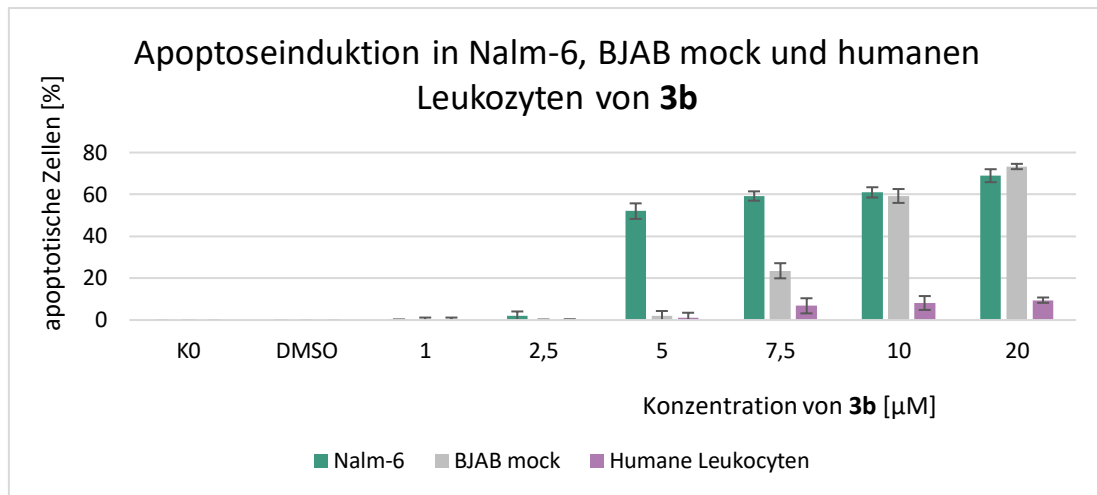


Abb. 59: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **2b** in Nalm-6, BJAB mock und humanen Leukozyten (n = 3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Ligand **2b** als auch der Rutheniumkomplex **3b** selektiv an den beiden Krebszelllinien angreifen und keine Apoptose in der nicht kanzerogenen Zelllinie bei Konzentration bis ca. 5 µM eingeleitet wird, wobei die Apoptose auch bei höheren Konzentrationen nicht nennenswert hervorgerufen wird.

4.4.4 Apoptoseinduktion in resistenten BJAB mock Zellen

Da bereits die BJAB Zellen zur Untersuchung hinzugezogen wurden, wurde das Apoptose-induzierende Verhalten von Komplex **3b** auch an resistenten Varianten dieser Zelllinie genauer untersucht. Bei der Zelllinie Bibo liegt eine Resistenzentwicklung gegen Vincristin und bei der Zelllinie 7-CCA eine Resistenz gegen Doxorubicin (Doxo) vor. Die jeweiligen Stoffe wurden als Kontrolle in den Versuch mit einbezogen. Es zeigt sich erneut, dass der IC₅₀-Wert von **3b** an BJAB mock Zellen einen Wert von ca. 9 µM aufweist. Jedoch wird auch ersichtlich, dass in der gegen VCR resistenten Krebszelllinie Bibo über den gesamten Konzentrationsbereich keine Apoptose induziert werden kann. Für die resistente Zelllinie 7-CCA sehen die Ergebnisse ähnlich aus. Zwar können bei Konzentrationen um die 5 µM noch apoptotische Zellen von ca. 5 % erreicht werden, allerdings verschwindet der Effekt bei einer Substanzkonzentration von 10 µM. Dadurch wird ersichtlich, dass **3b** die Resistenzen der Zellen nicht durchbrechen kann.

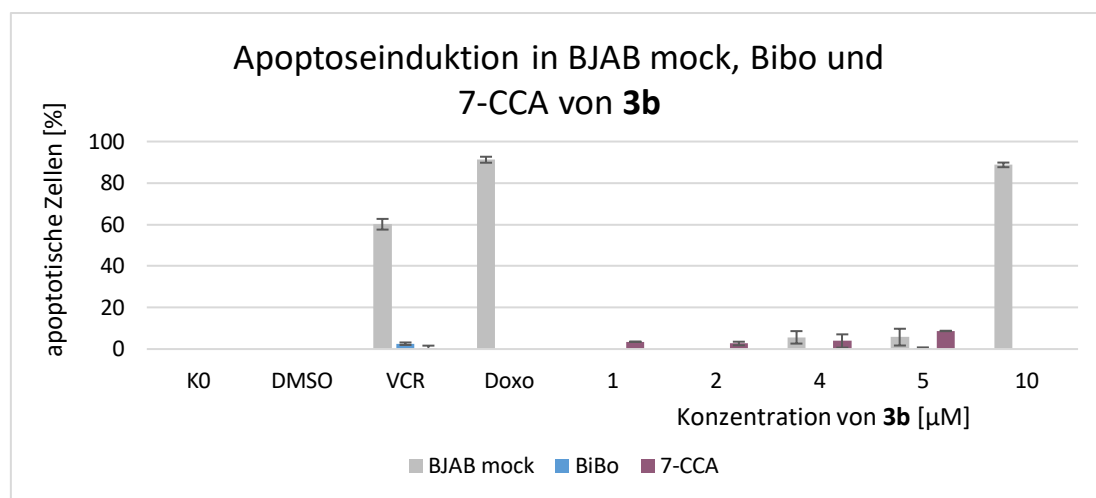


Abb. 60: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in BJAB mock, Bibo und 7-CCA (Vergleichssubstanzen: Vincristin (VCR) [5,6 nM] und Doxorubicin (Doxo) [184 nM], n = 3).

In den Bibo-Zellen ist das Bcl-2-Gen überexprimiert, wodurch vermehrt das antiapoptotische Protein Bcl-2 synthetisiert wird, welches inhibierend auf die proapoptotischen Proteine wirkt. [93] Das hat zur Folge, dass die Permeabilität der Mitochondrien nicht steigt, Cytochrom C aus den Mitochondrien nicht freigesetzt wird und die Apoptose verhindert werden kann. Substanz **3b** ist damit nicht in der Lage, dieses Protein zu verdrängen oder in die Kaskade einzugreifen. Jedoch wird die Apoptose anscheinend auch nicht über andere Signalwege eingeleitet. Daraus lässt sich schließen, dass die Verbindung **3b** über den intrinsischen Apoptoseweg wirken. Die Zelllinie 7-CCA enthält einen Genvektor mit herunterregulierten Caspase-3-Gen. [187] Die Caspase-3 triggert die Fragmentierung der DNA während der Apoptose. Da die Substanz **3b** an dieser Zelllinie, die sich durch fehlende Caspase-Aktivität auszeichnet, keine Aktivität zeigen, spricht das im Umkehrschluss dafür, dass die Substanzen gerade über die Beeinflussung der Caspase-Aktivität und damit auf dem intrinsischen Apoptoseweg wirken.

4.4.5 Beurteilung des apoptotischen Wirkmechanismus

Um noch stärkere Aussagen aus den bisher erzielten Ergebnissen treffen zu können und die Apoptose-induzierenden Eigenschaften des Ruthenium(II)-NHC-Komplexes **3b** besser beurteilen zu können, wurde die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus den Zellen eine Stunde nach Substanzzugabe gemessen. Diese Methode gibt über die Zellvitalität (%) Auskunft und dient dazu, den unspezifischen Zelltod auszuschließen. [193] Während der Apoptose findet keine LDH-Freisetzung statt, da die Zellmembran über die Zeit des Prozesses intakt bleibt. Hingegen wird bei der Nekrose die Zelle unspezifisch rupturiert und Zellproteine und Organellen in das Cytosol freigesetzt, wodurch die Freisetzung von LDH bestimmt werden kann. [193] Dargestellt sind die Ergebnisse als prozentuale

Zellvitalität gegenüber der eingesetzten Substanzkonzentration von **3b**. Erst wenn diese stark von 100 % abweicht, kann man von einer LDH-Freisetzung sprechen.

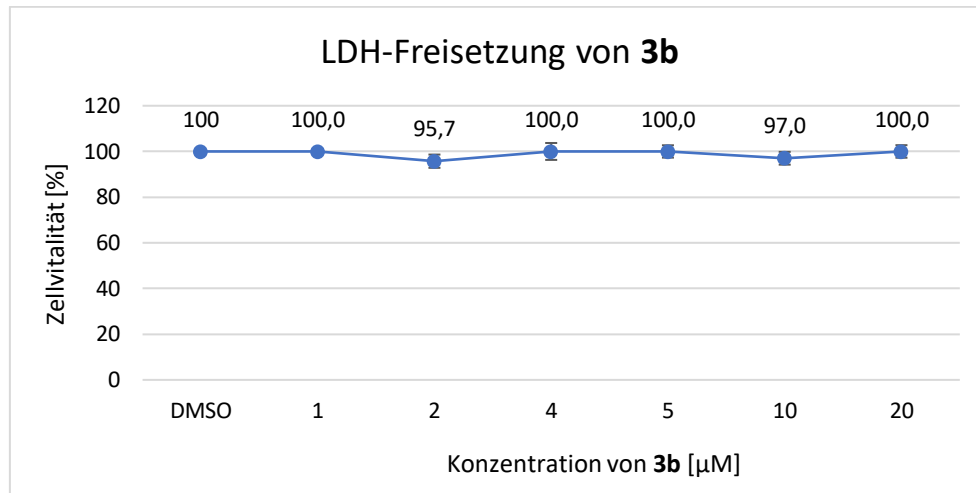


Abb. 61: Zellvitalität (in %) von Nalm-6 Zellen unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen von **3b** (n = 3). Die Zellvitalität gibt dabei Auskunft über Die Freisetzung von LDH.

Der Versuch zeigt deutlich, dass auch bei erhöhter Substanzkonzentration bis zu 20 µM LDH nicht oder nur geringfügig an die Umgebung abgegeben wird. Die Zellvitalität nimmt einen Wert von 100 %, bzw. minimal bis zu 96 % ein. Damit kann man festhalten, dass die gemessenen Zellfragmente in allen Versuchen auf Apoptose der Zellen zurückzuführen sind. Nekrotisches Verhalten der Zelle kann ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkmechanismen von **3b** in der Apoptose-Kaskade genauer zu untersuchen, bestand darin, **3b** an humanen Melanom-Zellen zu untersuchen. Diese enthalten im Genom einen eingebauten Vektor pires und das Bcl-2-Gen, wodurch das antiapoptotische Protein Bcl-2 überexprimiert und verstärkt biosynthetisiert wird. Auch diese Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von **3b** behandelt und die Anzahl apoptotischer Zellen (in %) mittels Durchflusszytometrie detektiert. An diesen Zelllinien konnte keine Apoptose induziert werden. Damit lässt sich erneut die Schlussfolgerung treffen, dass Komplex **3b** über den intrinsischen Apoptoseweg seine Wirkung entfaltet.

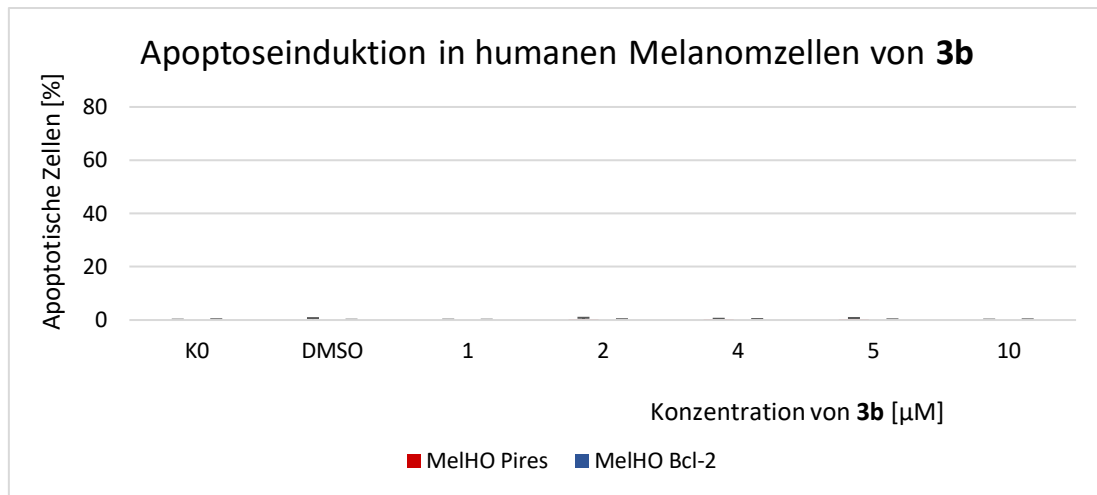


Abb. 62: Anzahl apoptotischer Zellen (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in humanen Melanomzellen mit Pires Vektor und Bcl-2-Gen (n = 3).

Mithilfe des kationischen Carbocyanin-Farbstoffes JC-1 ist es möglich, die Abnahme des Membranpotentials zu bestimmen. [194] Bei diesem Versuch ist der prozentuale Anteil der Zellen mit niedrigem Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) dargestellt. Das sind die Zellen, die sich mit dem Fluoreszenz-Farbstoff haben anfärben lassen. Dieser kann über Poren in die Mitochondrien gelangen. Diese Poren wurden zuvor durch Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg über die Bax/Bak-Proteine in der Mitochondrienmembran gebildet. Über die Poren wird letztendlich Cytochrom C freigesetzt, wodurch die Apoptose nicht mehr aufgehalten werden kann. [187]

Wenn das Membranpotential sinkt, wird die Zellmembran poröser und mehr Farbstoff kann in die Zellen gelangen. Das Ergebnis stellt somit die apoptotischen Zellen in % nach 48 h mit niedrigem Membranpotential dar.

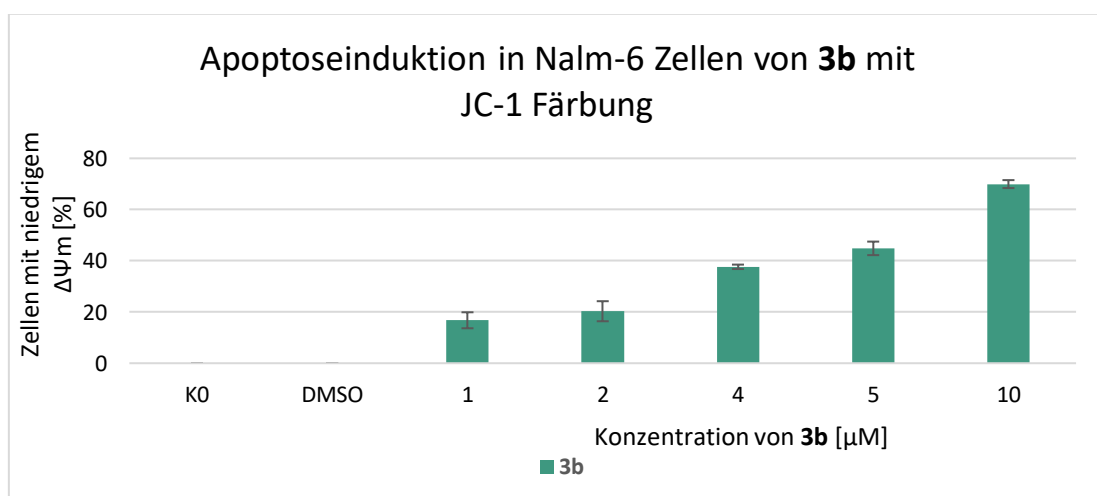


Abb. 63 Anzahl apoptotischer Zellen mit niedrigem $\Delta\Psi_m$ [%] (in %) nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in Nalm-6 mit JC-1 Färbung (n = 3).

Die Werte zeigen die gleiche Tendenz wie die Testung an Nalm-6 Zellen ohne JC-1 Färbung auf. Der LD₅₀-Wert von **3b** liegt erneut bei knapp über 5 µM. Der Anteil der apoptotischen Zellen ist also genauso hoch, wie der Anteil apoptotischer Zellen, die eine geringere Permeabilität der Membran aufweisen. Also untermauert auch dieser Versuch, dass **3b** über den intrinsischen Wirkungsmechanismus die Apoptose einleitet.

4.4.6 Bestimmung der proliferierenden Eigenschaften in Nalm-6 Zellen

Da die Apoptoseinduzierung in Nalm-6 Zellen auf unterschiedliche Weise nachgewiesen werden konnte, wurden darüber hinaus *in vitro* Testungen auf die Proliferationshemmung ausgeweitet. Hierbei ist die Zellanzahl und die Inhibierung der Zellproliferation den einzelnen Konzentrationen von **3b** gegenübergestellt. Der IC₅₀-Wert mittels Kristallviolett-Färbung wurde hier nicht bestimmt. Die Messung der Zellkonzentration erfolgte mittels CASY Cell Counter Analyser System (Roche Applied Science). Die Ausgangszellzahl wurde als 100 % gesetzt.

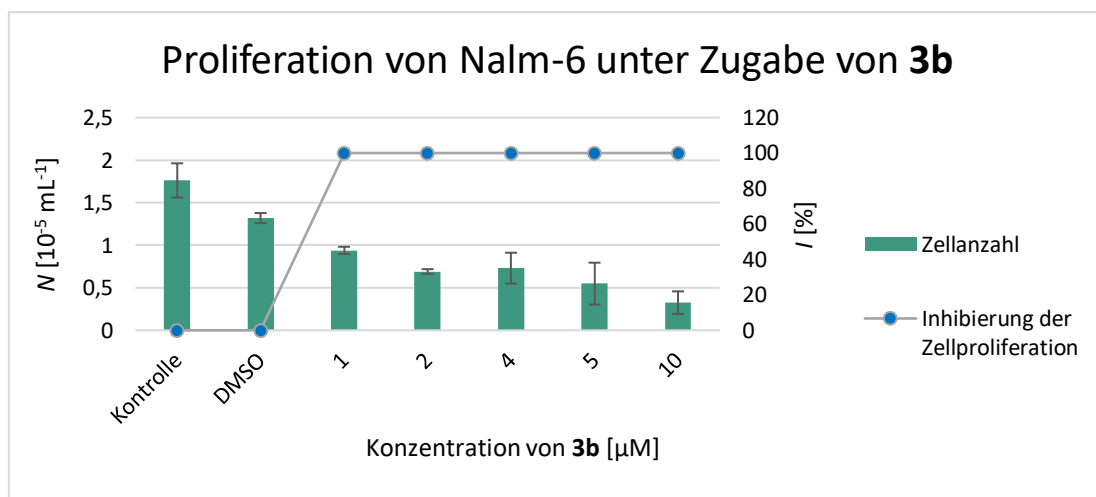


Abb. 64: Zellanzahl nach Substanzeinwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von **3b** in Nalm-6 mittels CASY Cell Counter Analyser System. (n = 3).

Bereits bei einer Konzentration von 1 µM wurde die Hälfte der Zellanzahl ermittelt, was eine Inhibierung der Zellproliferation von 100 % entspricht. Die Apoptosemechanismen wirken sich also auch auf die Zellzahl aus, indem **3b** die Zellproliferation inhibieren kann.

4.5 Inhibition der Thioredoxinreduktase

Einen potenziellen Wirkmechanismus zur Einleitung der Apoptose stellt die Inhibition der Thioredoxinreduktase dar. Diese wird in Krebszelllinien überexprimiert. Bei Inhibition des Enzyms steigt die Anzahl mitochondrialer Thiole an, wodurch die Permeabilität der Mitochondrienmembran negativ beeinflusst und die Freisetzung von Cytochrom C gefördert werden kann. [147]

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird der Farbstoff 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) oder auch Ellmannsreagenz verwendet. Dieser stellt in der Biochemie einen wichtigen Indikator zur Quantifizierung von Thiolen dar. [195] Die Messmethode beruht auf der enzymatischen Umsetzung von DTNB zum gelb gefärbten 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB), welche unter NADPH Verbrauch durch die TrxR katalysiert wird. [196]

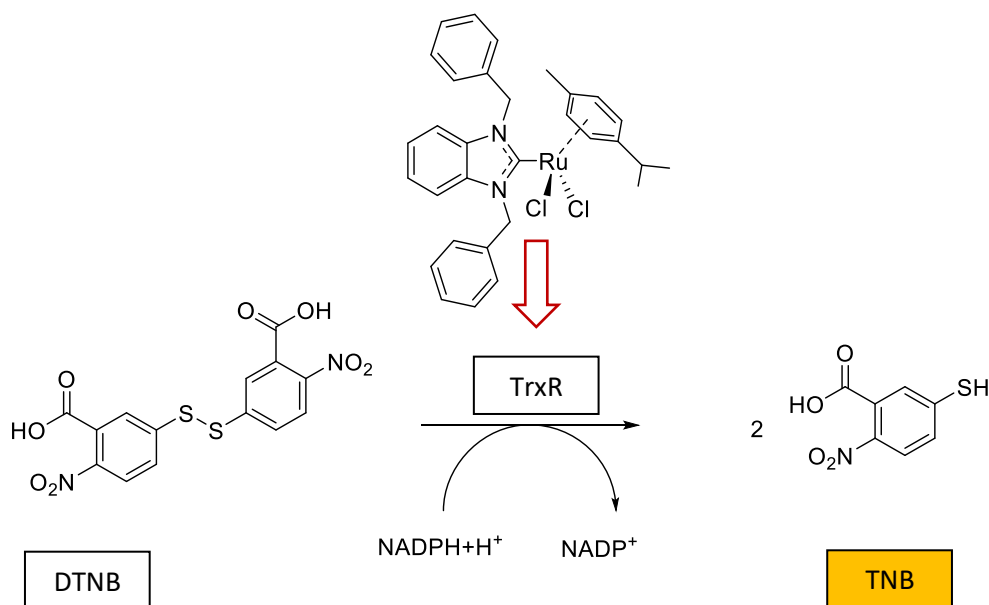


Abb. 65: Enzymtische Spaltung von DTNB zum gelb gefärbten TNB durch die TrxR unter NADPH Verbrauch. Inhibition der TrxR führt zu keiner Spaltung des DTNB und die Bildung des TNBs bleibt aus.

Bei Hemmung des Enzyms, z.B. durch Substanzzugabe, kann DNTB nicht mehr durch die TrxR gespalten werden. Die gelbe Färbung durch Bildung von TNB bleibt aus.

Die Thioredoxinreduktase der Ratte wurde bei Sigma Aldrich käuflich erworben. Um nicht nur Enzym und damit Geld zu sparen, sondern auch den Arbeitsaufwand geringer zu halten, können von großen Substanzserien Enzymvortestungen durchgeführt werden. Hierzu wird die prozentuale Enzyminhibition einer fixen Substanzkonzentration im Vergleich zur Positivkontrolle bestimmt. In den folgenden Ergebnissen wurde hierfür eine Substanzkonzentration von 10 µM ausgewählt. Gemessen wird die Restaktivität der TrxR. Die Differenzbildung zu 100 % liefert die Enzyminhibition. Die

Positivkontrolle stellt das reine Enzym ohne Substanzbehandlung dar. Die interessantesten Verbindungen im Vorscreening werden dann für die genaue IC₅₀-Wert-Bestimmung ausgewählt. Dazu werden die Restaktivitäten des Enzyms unter Behandlung einer Substanz innerhalb eines Konzentrationsbereichs bestimmt. Mithilfe einer graphischen Interpolation mittels der Funktion Boltzmann im Programm Origin, kann der IC₅₀-Wert bestimmt werden, welcher die Konzentration darstellt, bei der das Enzym zu 50 % inhibiert wird.

Der Versuch wurde nicht nur an den Ruthenium(II)-NHC-Komplexen, sondern auch an den (Benz)-Imidazoliumbromiden durchgeführt, um mögliche Ligandeneffekte am Enzym aufzuzeigen.

4.5.1 Inhibition der TrxR mit Substanzen mit Substitution in der 5-Position des Benzimidazols

Substanz	Substituent	Enzyminhibition [%]	IC ₅₀ -Werte [μM]
2a	-H	27,6 ^{±10,0}	>50
2b	-CH ₃	n.a.	>50
2c	-OCH ₃	n.a.	n.b.
2d	-F	14,1 ^{±4,6}	n.b.
2e	-Cl	n.a.	n.b.
2f	-Br	32,9 ^{±10,4}	>50
3a	-H	49,3 ^{±9,0}	4,9 ^{±1,6}
3b	-CH ₃	34,6 ^{±10,9}	17,8 ^{±5,6}
3c	-OCH ₃	12,4 ^{±1,6}	n.b.
3d	-F	10,3 ^{±3,9}	n.b.
3e	-Cl	4,3 ^{±6,4}	n.b.
3f	-Br	25,1 ^{±11,6}	40,2 ^{±0,2}
[(p-Cym)RuCl₂]₂	-	>100	n.b.

Tab. 14: Prozentuale Inhibition der TrxR im Vergleich zur Positivkontrolle [%], eingesetzte Substanzkonzentration 10 μM, n = 2, vs. IC₅₀-Werte in μM, n = 3, n.a.: nicht aktiv, n.b.: nicht bestimmt.

Der Ligand **2d** zeigt mit 14 % Enzyminhibition nur eine schwache Interaktion am Enzym. Bei Substanzen **2a** und **2f** konnten mit ca. 28 %, bzw. 33 % doppelt so hohe Werte erreicht werden. Die anderen

Liganden **2b**, **2c** und **2e** sind am Enzym nicht aktiv, d.h. es konnte bei einer Substanzkonzentration von 10 μM keine Enzyminhibition ermittelt werden.

Im Vergleich dazu erreichen die Komplexe deutlich höhere prozentuale Enzyminhibitionen an der TrxR. Der Komplex **3e** ist mit knapp 4 % sehr gering aktiv am Enzym. Wenn man die Standardabweichung mit einbezieht, lässt sich von einer nicht vorhandenen Aktivität sprechen. Die Substanzen **3c** und **3d** sind mäßig aktiv mit prozentualen Inhibitionen von ca. 10 %, bzw. 12 %. Die aktivste Form stellt der unsubstituierte Rutheniumkomplex **3a** dar, welcher mit 49 % das Enzym zur Hälfte inhibiert.

Aufgrund dieser Vortestungen wurden sowohl von den Liganden (2er-Reihe) und wie den Komplexen (3er-Reihe) die Vertreter **a,b,f** für die IC_{50} -Wert-Bestimmungen ausgewählt. Die Liganden zeigen hierbei alle einen IC_{50} -Wert von über 50 μM auf. Der bromierte Komplex **3f** besitzt mit einem IC_{50} -Wert von ca. 40 μM eine sehr geringe Aktivität an der TrxR. Deutliche Aktivitätssteigerung wird bei dem methylierten Komplex **3b** erreicht. Der niedrigste IC_{50} -Wert mit ca. 5 μM wird mit dem unsubstituierten Komplex **3a** gemessen.

4.5.2 Inhibition der TrxR mit Imidazolderivaten

Auch die Imidazolderivate wurden am Enzym getestet, wobei ein deutlicherer Aktivitätsunterschied ersichtlich wird (siehe Tab. 15).

Substanz	Substituent	Enzyminhibition [%]	IC_{50} -Werte [μM]
2g	-H	$8,9^{\pm 8,8}$	>50
2h	-Br	n.a.	n.b.
3g	-H	$55,6^{\pm 6,1}$	$19,5^{\pm 2,9}$
3h	-Br	n.a.	n.b.

Tab. 15: Prozentuale Inhibition der TrxR im Vergleich zur Positivkontrolle [%], eingesetzte Substanzkonzentration 10 μM , n = 2, vs. IC_{50} -Werte in μM , n = 3, n.a.: nicht aktiv, n.b.: nicht bestimmt.

Sowohl der bromierte Ligand **2h** als auch der korrespondierende Komplex **3h** zeigen bei 10 μM keine Enzyminhibition und sind damit am Enzym nicht aktiv. Hingegen zeigt der unsubstituierte Ligand **2g** mit 10 % eine mäßige Interaktion am Enzym. Eine deutlich höhere Enzyminhibition wird mit ca. 56 % durch den Komplex **3g** erreicht. Vergleicht man diesen Wert mit der prozentualen Enzyminhibition von **3a**, welche bei knapp 50 % lag, müsste man davon ausgehen, dass Komplex **3a** und **3g** IC_{50} -Werte im

gleichen mikromolaren Bereich aufzeigen. Jedoch hat die IC_{50} -Wert-Bestimmung ergeben, dass Komplex **3g** mit einem IC_{50} -Wert mit ca. 20 μM eine vierfach geringere Aktivität an der TrxR aufweist. An diesem Beispiel zeigt sich, dass der Vortest zwar eine gute Möglichkeit ist die Aktivität der Substanzen grob abzuschätzen und einzuordnen, aber man erst durch die IC_{50} -Wert-Bestimmung fundierte Aussagen treffen kann. Der Ligand **2g** zeigt mit einem IC_{50} -Wert > 50 μM keine signifikante Interaktion am Enzym.

4.5.3 Inhibition der TrxR mit Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden

Substanz	Substituent	Seitenkette	Halogenido-Ligand	Enzyminhibition [%]	IC_{50} -Werte [μM]
3a	-H	-Bn, -Bn	-Cl	49,3 \pm 9,0	4,9 \pm 1,6
3a_{Br}	-H	-Bn, -Bn	-Br	43,8 \pm 5,3	n.b.
3a_I	-H	-Bn, -Bn	-I	70,7 \pm 7,9	7,8 \pm 2,2
3a_{Cl}-Me	-H	-Me, -Me	-Cl	35,6 \pm 5,9	n.b.
3a_{Br}-Me	-H	-Me, -Me	-Br	29,0 \pm 1,7	n.b.
3a_I-Me	-H	-Me, -Me	-I	29,3 \pm 3,8	n.b.
3a_{Cl}-MeBn	-H	-Me, -Bn	-Cl	27,7 \pm 7,8	n.b.
3a_{Br}-MeBn	-H	-Me, -Bn	-Br	38,9 \pm 6,7	n.b.

Tab. 16: Prozentuale Inhibition der TrxR im Vergleich zur Positivkontrolle [%], eingesetzte Substanzkonzentration 10 μM , n=2, vs. IC_{50} -Werte in μM , n=3, n.a.: nicht aktiv, n.b.: nicht bestimmt.

Die Substanzen zeigen alle Inhibitionen von 30-40 %, wobei die Komplexe mit Methylseitenketten an den Stickstoffen der Benzimidazole (**3a_{Cl}-Me**, **3a_{Br}-Me** und **3a_I-Me**) mit Inhibitionen von ca. 30 % deutlich geringer aktiv am Enzym sind. Die Komplexe mit Methyl- und Benzylseitenkette **3a_{Cl}-MeBn** und **3a_{Br}-MeBn** liegen mit 30-40 % in einem ähnlichen Rahmen. Die benzylierten Komplexe **3a**, **3a_{Br}** und **3a_I** zeigen eine deutlich stärkere Enzyminhibition von 45-70 %. Die aktivste Verbindung stellt der Komplex **3a_I** mit einer deutlich erhöhten Enzyminhibition von 71 % dar. Von dieser Verbindung wurde anschließend auch der IC_{50} -Wert bestimmt, der mit 7,8 μM im unteren mikromolaren Bereich liegt. In der Benzylreihe **3a** stellt der Komplex mit Iodido-Liganden die aktivste Substanz dar, vor den Bromido- und Chlorido-Komponenten. Das lässt sich auch für die gemischt-substituierten Komplexe **3a-MeBn**

bestätigen. Der Austausch von Chlorido-Liganden von **3a_{Cl}-MeBn** zu Bromidoliganden **3a_{Br}-MeBn** führt hier zu einer Verstärkung der Inhibition um 10 %. Jedoch zeigt sich, dass der ermittelte IC₅₀-Wert von **3a** mit 4,9 µM doch etwas niedriger ist als der entsprechende Iodido-Komplex **3a_I** mit 7,8 µM. Es wird also erneut ersichtlich, dass man aus den prozentualen Inhibitionswerten keine endgültigen Schlüsse ziehen kann und zu besserer Vergleichbarkeit die IC₅₀-Werte herangezogen werden müssen. Innerhalb der methylierten-Benzimidazol-Reihe lässt sich keine Aktivitätserhöhung durch Austausch vom Chlorido- zu anderen Halogenido-Liganden beobachten. Hier ist der Komplex mit Chlorido-Liganden **3a_{Cl}-Me** mit ca. 36 % Enzyminhibition am aktivsten im Vergleich zu den Komplexen mit Bromido- und Iodido-Liganden (**3a_{Br}-Me** und **3a_I-Me**) mit um die 29 % Enzyminhibition.

4.5.4 Inhibition der TrxR mit Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Pyrithion-Ligand

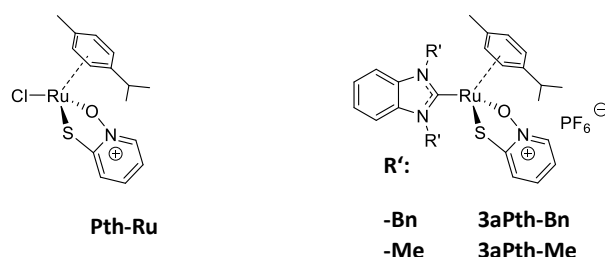


Abb. 66: Strukturen des getesteten Ruthenium(II)-Pyrithion-Komplexes und der Ruthenium(II)-NHC-Pyrithion-Komplexe.

Substanz	Enzyminhibition	IC ₅₀ -Werte
	[%]	[µM]
Pth-Ru	87,0 ^{±11,3}	7,8 ^{±1,4}
3aPth-Bn	38,3 ^{±13,3}	9,8 ^{±0,9}
3aPth-Me	21,0 ^{±11,0}	n.b.

Tab. 17: Prozentuale Inhibition der TrxR im Vergleich zur Positivkontrolle [%], eingesetzte Substanzkonzentration 10 µM, n=2, vs. IC₅₀-Werte in µM, n=3, n.a.: nicht aktiv, n.b.: nicht bestimmt.

Die größte prozentuale Inhibition der TrxR mit 87 % wird mit **Pth-Ru** erreicht. Der Ruthenium-NHC-Pyrithionkomplex **3aPth-Bn** weist eine mäßige Hemmung am Enzym auf mit ca. 38 %. Das entsprechende Derivat mit Methylseitenketten **3aPth-Me** zeigt eine noch geringere Aktivität mit 21 %. Die IC₅₀-Werte wurden von **Pth-Ru** und **3aPth-Bn** bestimmt. Auch wenn die prozentuale Inhibition der beiden Komplexe große Unterschiede zeigen, liegen die IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich

mit knapp unter 10 μM . Dabei wird mit **Pth-Ru** noch ein etwas geringerer IC_{50} -Wert mit 8 μM als mit **3aPth-Bn** mit knapp unter 10 μM erreicht.

4.5.5 Referenzen

Es konnten mit den neu synthetisierten Komplexen bereits Inhibitionen der TrxR durch Substanzkonzentrationen im unteren mikromolaren Bereich erreicht werden. Vergleicht man diese Werte mit bereits publizierten Daten, stellt man allerdings fest, dass es weitaus potentere Strukturen gibt, auch im Bereich der Rutheniumkomplexe.

Die Strukturen, die die Leitstruktur dieser Arbeit geliefert haben (Komplex **3a**) zeigen deutlich niedrigere IC_{50} -Werte $< 1 \mu\text{M}$. Die höchste Aktivität mit 0,3 μM wurde mit dem Komplex mit Methylseitenketten am Benzimidazol-Grundkörper **3a-Me** erhalten. [126] In den Vortests konnte mit diesem Komplex nur eine prozentuale Inhibition von knapp 35 % erreicht werden (siehe Tab. 16) Auch der Komplex **3a** und der Ruthenium-Dimer **[(p-Cym)RuCl₂]₂** wurden bereits getestet. Die deutlichen Schwankungen zwischen den alten und neuen Messungen (siehe Tab. 18) lassen sich auf unterschiedliche Enzymchargen zurückzuführen. Vor allem die Vorstufe **[(p-Cym)RuCl₂]₂** bildet hier eine gute Argumentationsgrundlage. Da es sich bei dieser Substanz um eine käuflich erworbene Komponente handelt, können die Schwankungen nicht an der Durchführung der Synthese oder Reinheitsgrade der Produkte liegen. Da man den IC_{50} -Wert immer relativ zur Positivkontrolle (Enzymaktivität ohne Substanzbehandlung) berechnet, kann auch fehlerhaftes Durchführen des Versuches ausgeschlossen werden. Eine unterschiedliche Enzymcharge kann allerdings zu Abweichungen in den Messergebnissen führen. Zeitgleich durchgeführte Versuche für verschiedene Substanzen liefern in der Regel mit dieser Methode eine gute Vergleichbarkeit, sodass die alten Messdaten untereinander und auch die neuen Messdaten untereinander konsistent sind. Alte und neue Daten sollten damit nicht miteinander verglichen werden.

Substanz	IC ₅₀ alt (nach [126]) [μM]	IC ₅₀ neu [μM]
[(<i>p</i> -Cym)RuCl ₂] ₂	0,78 ^{±0,05}	>10
2a-Ethyl	>100	n.b.
3a	0,78 ^{±0,56}	4,9 ^{±1,6}
3a-Me	0,30 ^{±0,03}	n.b.
3a-Ethyl	3,74 ^{±0,05}	n.b.
3a-Isopropyl	0,74 ^{±0,56}	n.b.

Tab. 18: Vergleich von bereits veröffentlichten IC₅₀-Werten von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen und der neu bestimmten IC₅₀-Werte an der TrxR.

Die Rutheniumkomplexe wechselwirken mit der TrxR, zeigen jedoch bei weitem kein so hohes inhibitorisches Potential wie Gold-NHC-Komplexe. Vergleicht man die IC₅₀-Werte miteinander, stellen die Goldkomplexe deutlich potentere Strukturen dar. So konnten mit Goldchlorid-Komplexen mit Fluorphenylimidazolgrundkörper IC₅₀-Werte < 0,1 μM erreicht werden. [197]

Viele Wechselwirkungen mit biologischen Zielstrukturen beruhen auf der Tatsache, dass die zugesetzten Stoffe als Elektrophil mit nukleophilen Zielstrukturen interagieren und entsprechende Bindungen ausüben. [198] Dieses Prinzip lässt sich auf der Grundlage des HSAB-Konzepts nach Pearson erklären, wonach weiche Säuren bevorzugt mit weichen Basen reagieren. [199] Die Wechselwirkung der Metallkomplexe mit der Säugetier-TrxR beruht auf der Bindung an ein Selenocystein im aktiven Zentrum, welches unter physiologischem pH-Wert deprotoniert vorliegt. [200]

Das Selenocystein stellt eine weiche Base dar, das entsprechende Metall die Säure. Da es sich bei Gold(I) um eine weichere Säure als Ruthenium(II) handelt, bindet es bevorzugt an das Selenocystein im aktiven Zentrum der TrxR, wodurch auch niedrigere IC₅₀-Werte erzielt werden können. Auch die unterschiedliche Geometrie der Goldkomplexe und daraus resultierend räumliche Anordnung könnte die potentere Aktivität erklären.

4.6 Zusammenfassung

Den Einfluss auf die Zellviabilität sowohl der NHC-Liganden (gemessen als (Benz-) Imidazoliumhalogenide) als auch der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe konnte erfolgreich gezeigt werden.

Die Vorstufen zeigen keine Aktivität auf das proliferierende Verhalten der Zelle (IC_{50} -Werte > 100). Doch bereits durch NHC-Liganden konnten die Aktivität mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich erhöht werden, welche durch die Komplexierung an das Ruthenium-Fragment in den meisten Fällen deutlich verstärkt wurde. Ausnahme bildeten hierbei lediglich die Strukturen **2b/3b**, sowie die Imidazolderivate **2g-i** und **3g-i**. Es konnte bei allen Strukturen keine Selektivität an Tumorzellen im Zellviabilitätstest festgestellt werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen in Hinblick auf Aktivitätssteigerung im Zellviabilitätstest festhalten:

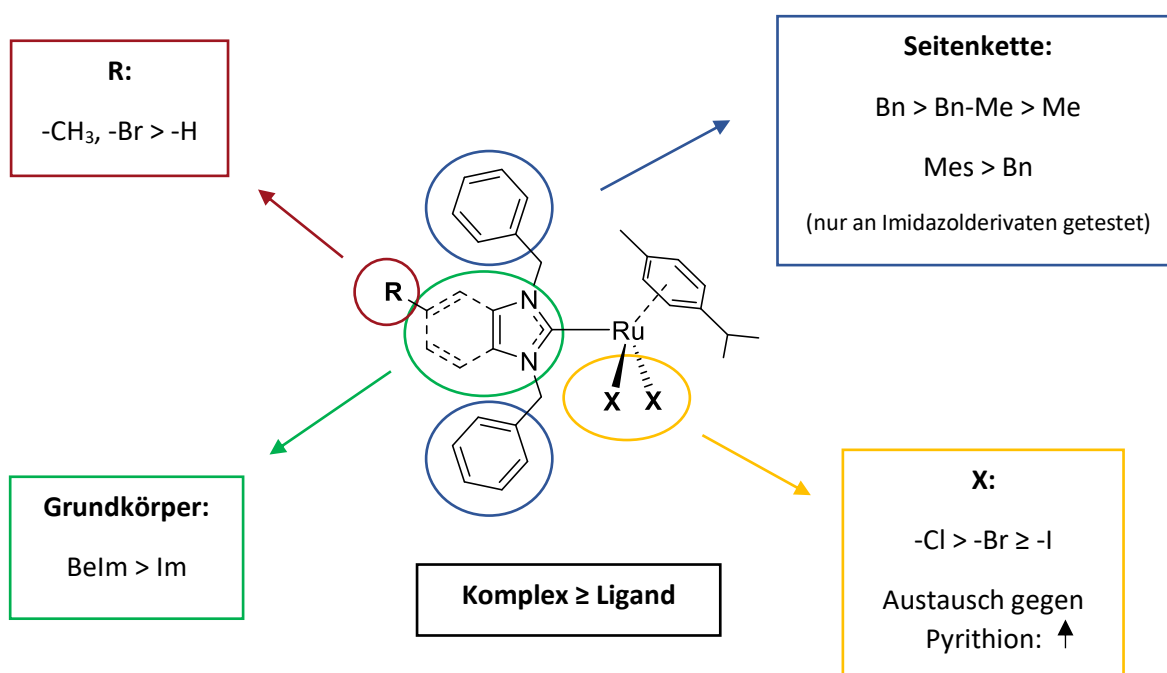


Abb. 67: Mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe auf Grundlage der Aktivität im Zellviabilitätstest mittels Kristallviolett.

Das Benzimidazol erwies sich als Grundkörper aktiver als das Imidazol. Die Aktivität konnte mit einem Methyl-, bzw. Brom-Substituenten an der 5-Position am Benzimidazol (bzw. 4-Position am Imidazol) erhöht werden. Positiven Einfluss auf die antiproliferierenden Eigenschaften üben große Reste an den Stickstoffen aus, wobei Mesitylen- und doppelt-benzylierte Seitenketten den größten Einfluss zeigten. Der Austausch der Chlorido-Liganden gegen andere Halogenide konnte keine Aktivitätssteigerung hervorbringen. Jedoch resultierte der Austausch gegen Pyrrhion in einer deutlichen Zunahme der antiproliferierenden Eigenschaften unabhängig von der Größe der Seitenketten.

Darüber hinaus haben die Konfluenzmessungen und Videomikroskopaufnahmen gezeigt, dass die Substanzen zytotoxisch wirken. Das Absterben der Zellen wird morphologisch sichtbar. Zahlreiche

Testungen innerhalb der Kooperation mit Dr. Dr. Aram Prokop konnten diese Wirkqualität untermauern und zudem aufzeigen, dass die zytotoxische Wirkung durch Einleitung der Apoptose vermittelt wird. Nekrotisches Verhalten konnte aufgrund geringer LDH-Freisetzung ausgeschlossen werden. Die Apoptose wird über den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg in den Zellen eingeleitet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Substanzen **2b** und **3b** Substrate des P-Glykoproteins sind. Dadurch konnten Resistenzen in verschiedenen leukämischen Zellen (NVCR, NDauno) nicht durchbrochen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Zellen Mako (Resistenz gegen Cytarabin) und Naku (Resistenz gegen Dexamethason), deren Resistenz offenbar nicht auf das P-Glykoprotein zurückzuführen ist, die Resistenzen überwunden. Damit stellen die Substanzen eine Alternative oder Ergänzung zu der Kombinationstherapie von Cytarabin mit Glucocorticoiden dar, welche häufig bei der Therapie der ALL eingesetzt wird. Darüber hinaus wurde keine Apoptose in humanen Leukozyten induziert, wodurch die unabdingbare Selektivität gegenüber leukämischen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Als mögliches Target zur Einleitung der Apoptose und des zytotoxischen Verhaltens der Substanzen wurde die Inhibition der Thioredoxinreduktase untersucht. Auch hier können erste potenzielle Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden:

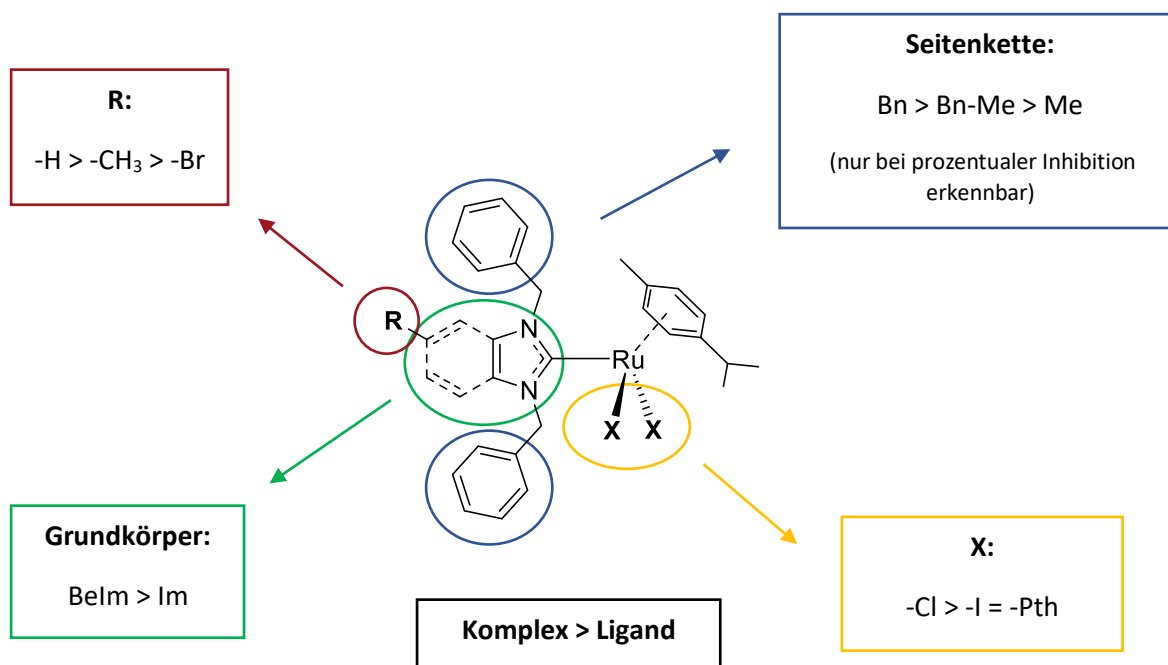


Abb. 68: Mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe auf Grundlage der Inhibitionen der Thioredoxinreduktase.

Die NHC-Liganden zeigten hierbei keinen Einfluss am Enzym. Obwohl die NHC-Liganden einen Einfluss auf die Zellviabilität und Einleitung der Apoptose in den Zellen besitzen, benötigt man für die

Interaktion mit der TrxR zwingend das Rutheniumfragment. Hierbei konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, welche Liganden und welche Ligandeneigenschaften des Rutheniums für die Wechselwirkung unverzichtbar sind. Während beispielsweise das Ruthenium-Dimer $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ bei 10 μM keine Inhibition des Enzyms zeigte, lag der IC_{50} -Wert des Rutheniumkomplexes **Pth-Ru** bei ca. 8 μM . Durch die Bindung dieses Strukturelements an einen NHC-Liganden wurde die Aktivität nur leicht verschlechtert auf knapp unter 10 μM . Der Ruthenium-NHC-Komplex **3a** ohne Pyrithion-Ligand aber mit Chlorido-Liganden stellte sich innerhalb der Messreihe mit einem IC_{50} -Wert von ca. 5 μM als die potenteste Verbindung heraus. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um diejenigen Einflussfaktoren, wie z.B. Komplexgröße, konformative Beweglichkeit und elektronische Eigenschaften der Liganden, im Detail zu ergründen, die zu einer starken Inhibition der Thiothoxinreduktase führen.

5. Bestimmung der Biodistribution

Neben der Beurteilung der Zytotoxizität stellt auch die Distribution eines Arzneistoffes einen wichtigen Bestandteil in präklinischen Studien dar. Sie gibt nicht nur Auskunft über die Verteilung im Organismus, sondern liefert auch Erkenntnisse und erste Anhaltspunkte über mögliche Dosierungen und Art der zukünftigen Darreichungsform eines Arzneistoffes.

Ein Arzneistoff wird zunächst in den Organismus aufgenommen (Absorption), ehe er im Organismus verteilt (Distribution), verstoffwechselt (Metabolisierung) und anschließend ausgeschieden (Eliminierung) wird (ADME-Modell). [201] Die Verteilung im Zielorganismus ist ein bedeutsamer Parameter in der pharmazeutischen Entwicklung, der für das pharmakodynamische und vor allem auch pharmakokinetische Verhalten eines Arzneistoffs mitentscheidend ist. Verteilungsvorgänge werden maßgeblich durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffes bestimmt. Für die Verteilung ist der vorherige Transport durch biologische Membranen grundlegend (siehe Abb. 69): dieser kann u.a. durch passive Diffusion, Carrier-vermittelten passiven Transport entlang eines Konzentrationsgradienten durch Transportproteine oder aktiven Transport mittels ATPasen unter ATP-Verbrauch stattfinden. [201]

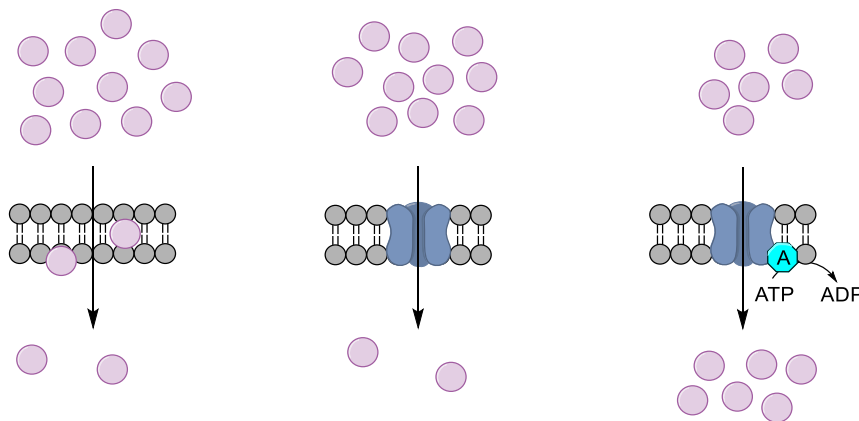


Abb. 69: Mögliche Transportprozesse durch Biomembranen: passive Diffusion, Carrier-vermittelter passiver Transport entlang eines Konzentrationsgradienten und aktiver Transport unter ATP-Verbrauch.

Bei den passiven Transportmechanismen spielt vor allem die Lipophilie des Wirkstoffes eine tragende Rolle. Lipophile Moleküle können leichter durch Lipidschichten diffundieren. Hingegen passieren dissoziierte Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht die Membran eher durch wassergefüllte Poren, welche durch Proteine in der Lipiddoppelschicht gebildet werden. Das Verteilungsverhalten eines Arzneistoffs kann durch den Verteilungskoeffizienten P , der meist in logarithmierter Form als $\log P$ -Wert ausgedrückt wird, beschrieben werden. Der Verteilungskoeffizient bezeichnet das

Verhältnis der Substanzkonzentration in einer organischen mit Wasser nicht mischbaren Phase zu der Substanzkonzentration in einer wässrigen Phase. Wird als organisches Lösungsmittel 1-Octanol verwendet, spricht man vom Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Da die Verteilung einer Substanz entscheidend abhängig ist von ihrer Dissoziation, muss diese durch den Dissoziationsgrad α Berücksichtigung finden. Bei biologischen Systemen ist hierbei der Dissoziationsgrad beim physiologischen pH-Wert 7.4 von entscheidender Bedeutung. Damit ergibt sich vereinfacht folgender Zusammenhang, der Dissoziationsvorgänge in der organischen Phase unberücksichtigt lässt. [201]

$$P_{ow} = \frac{[\text{Arzneistoff}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Arzneistoff}]_{\text{Wasser}} * (1 - \alpha)}$$

Eine Einschätzung der Bioverfügbarkeit und damit der Absorption bzw. Permeation durch Biomembranen kann durch die Lipinski Rule of Five beschrieben werden. [202] Erfüllt ein Wirkstoff zwei oder mehrere der folgenden Kriterien, besitzt dieser eine schlechte Bioverfügbarkeit, bzw. ein schlechtes Absorptionsverhalten bei passiven Transportvorgängen:

- Molekulargewicht > 500
- Log P-Wert > 5
- Wasserstoffbrücken-Donatoren > 5
- Wasserstoffbrücken-Akzeptoren > 10

Die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren der neu synthetisierten Komplexe sind gering. Für die Leitstruktur **3a** ergeben sich lediglich zwei Wasserstoffakzeptoren. Das Molekulargewicht der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe liegt bei > 600 g / mol und erfüllt damit nicht die Rule of Five. Für Metallkomplexe ist es nicht möglich rechnerisch einen log P-Wert vorherzusagen. Eine Möglichkeit zur Bestimmung stellt das Ausschütteln der Komplexe und anschließende Bestimmung des Metallgehaltes in der Octanol- und Wasserphase dar. Für Phenylgoldchloride konnten damit schon log P-Werte > 2 experimentell bestimmt werden. [203]

Im Folgenden wird mit experimentellen Methoden versucht wird, die Absorption (Verteilung) der Komplexe durch Biomembranen zu evaluieren. Um Aussagen über die Biodistribution der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe treffen zu können, wurden verschiedene Zellaufnahmestudien durchgeführt und zusätzlich von einigen Komplexen die Proteinbindung an BSA bestimmt. Die Messung beruht auf der Bestimmung des Metallgehalts mittels HR-CS-AAS.

5.1 Die Vermessung des Rutheniumgehalts mittels HR-CS-AAS

Die Grundlage der Atomabsorptionsspektrometrie beinhaltet die Absorption einer Primärstrahlung durch Analytatom im Grundzustand. Das Extinktionssignal entspricht dabei der Konzentration des betreffenden Elements. [204] Da Atome im Grundzustand nur eine bestimmte Wellenlänge absorbieren, handelt es sich um eine elementspezifische Methode.

Ein AAS-Gerät ist schematisch wie folgt aufgebaut:

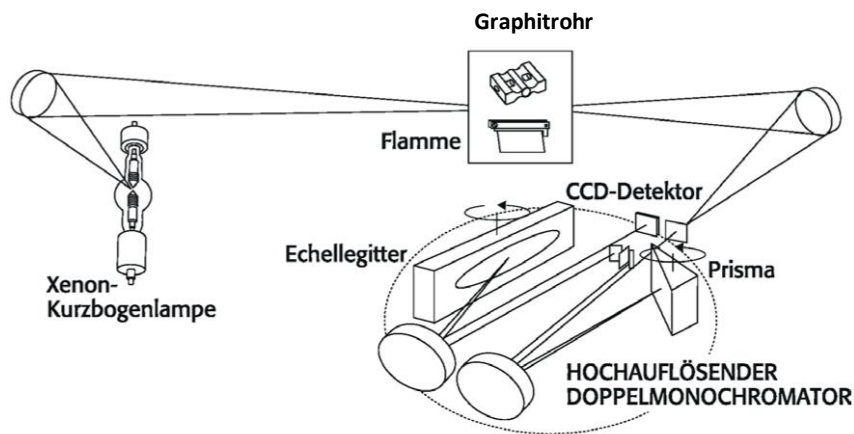


Abb. 70: Schematischer Aufbau eines HR-CS-AAS Gerätes. [204]

Der größte Unterschied der HR-CS zu einem LS-Gerät (Line Source, Linienstrahler) stellt die Verwendung einer Xenonkurzbogenlampe als Kontinuumsstrahler dar. Dadurch ist es möglich innerhalb eines Spektralbereiches von 185 nm – 900 nm eine lückenlose Emission zu garantieren. [205] Ein LS-Gerät enthält in der Regel eine elementspezifische Hohlkathodenlampe, bei der die Kathode aus dem zu bestimmenden Metall besteht. [206] Damit bringt der Kontinuumsstrahler große Vorteile mit sich, da der Wechsel der Lampe je nach Verwendung der Wellenlänge entfällt und somit Zeit und Kosten eingespart werden können.

Darüber hinaus enthält das Gerät einen hochauflösenden Doppelmonochromator: Am Prisma wird die Strahlung zerlegt, der Bereich der Analysenlinie gelangt zum Echellegitter. Dort wird der Bereich der Analysenlinie hoch aufgelöst und vollständig zum Detektor geleitet, wodurch eine 100-fach bessere Auflösung als bei der LS-AAS erreicht werden kann. [207]

Der Detektor stellt einen CCD-Detektor dar (Charge-coupled device), der sich am Austrittsspalt des Monochromators befindet. Er besteht aus ca. 588 Pixeln, wovon ca. 200 Pixel zur Auswertung herangezogen werden. [208] Fünf davon werden für die Intensität der Analysenlinie verwendet. Der

Rest registriert die spektrale Umgebung und trägt zur Untergrundkompensation bei. [208] Die Signale sind dadurch deutlich stabiler als bei einer LC-AAS. Es wird damit nicht nur das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, sondern auch niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht.

Die Messungen wurden mit der Graphitrohrofen-Technik durchgeführt, die die bekannteste unter den Atomisierungs-Techniken bei der Atomabsorptionsspektroskopie darstellt. Hierbei wird der Analyt in kleinen Probevolumina in ein Graphitrohr injiziert, welches einem Temperaturprogramm ausgesetzt wird. [209] Die Schritte innerhalb des Programms sind der Tab. 19 zu entnehmen.

Schritt	Vorgang
Trocknung	Verdampfen des Lösemittels und Trocknen der Probe
Pyrolyse	Entfernen der Matrix
Atomisierung	Zielelement wird in Gasphase überführt
Ausheizen	Entfernen der Rückstände

Tab. 19: Einzelne Schritte des Trocknungsprogramms bei der Graphitrohr-Technik der AAS.

Durch diese Technik ist es möglich, auch nicht gelöste Proben, wie die Suspensionen der Zellaufnahmestudien, zu vermessen. Die Anwendung des Temperaturprogramms des Analyten hat zur Folge, dass Matrixbestandteile vor der Atomisierung abgetrennt werden. Der eigentliche Analyt wird schlagartig in einer Inertgasatmosphäre atomisiert, wodurch weniger Interferenzen als bei der Flammentechnik auftreten. [209] Der größte Unterschied zur bekannten Flammentechnik, stellt die Gasphase der Atomisatoren dar. Bei der Flammentechnik bestimmen die heißen Flammengase (meist eine Luft-Acetylen-Flamme) die Umgebungsatmosphäre, während bei der Graphitrohrofentechnik Inertgasatmosphäre vorherrscht. Diese und die reduzierende Wirkung von glühendem Graphit schaffen ideale Bedingungen für die Atomisierung des Analyten. [209]

Bei der Graphitrohrofen-Technik erfolgt der Massentransport durch Diffusion, wodurch die Aufenthaltsdauer der Atome in der Absorptionswolke 2-3x länger ist als bei der Flammentechnik, bei der die Probelösung kontinuierlich versprüht wird. Dadurch können eine größere Empfindlichkeit und kleinere Nachweisgrenze erzielt werden. [209]

Ruthenium wird bei einer Wellenlänge von 349.49 nm detektiert. [209] Die optimale Atomisierungstemperatur von Ruthenium liegt bei 2400-2500°C, welche mit 2400°C in der verwendeten Methode in der Atomisierungsphase erreicht wurde. [209,210]

5.2 Einführung in die Zellaufnahmestudien in MCF-7 Brustkrebszelllinien

Für die Zellaufnahmestudien wurden MCF-7 Zellen verwendet, da die Rutheniumkomplexe an dieser Zelllinie im Zytotoxizitätstest die stärksten antiproliferativen Eigenschaften zeigten (siehe Kapitel 4.1). Alle Experimente stellen mit Inkubationszeiträumen von 1, 4, 8 und 24 Stunden zeitabhängige Versuche dar. Da man den Rutheniumgehalt über einen längeren Zeitraum verfolgen kann, lassen sich so erste Rückschlüsse über Transportmechanismen der Komplexe in der Zelle ziehen.

Während der Vorversuche hat sich gezeigt, dass vor allem am ersten Messpunkt nach einer Stunde Inkubationszeit bei vielen Proben noch wenig bis gar kein Ruthenium detektiert werden konnte. So wurde die verwendete Methode leicht modifiziert und das Injektionsvolumen von 25 µL auf 50 µL erhöht. [210] Zudem wurden die Proben nicht bei einem Proteingehalt von 1 mg / mL, sondern 1,5 mg / mL vermessen. Diese Änderungen hatten zufolge, dass bei zahlreichen Komplexen auch nach bereits 1 h Ruthenium detektiert und damit die Nachweisgrenze erfolgreich überschritten werden konnte.

In der Zellkultur werden dem Zellmedium normalerweise Zusätze in Form von fetalem Kälberserum (FCS) hinzugegeben. Das Nährmedium versorgt die Zellen mit den nötigsten Nährstoffen. Das Serum liefert für die Zellen notwendige Botenstoffe, wie Hormone zur Stimulierung des Zellwachstums und Zellteilung, aber auch Bindungsproteine wie Albumin oder Transportproteine wie Transferrin, sowie Wachstumsfaktoren, um die nötigen Zell-Zell-Kontakte auszubilden. [181]

Die Verwendung von FCS in Zelllaboren steht in der Kritik, da diese nicht nur Nutzen mit sich bringt. Abgesehen von dem ethischen Problem, dass für die Gewinnung von FCS jährlich eine Million Rinderföten geschlachtet werden müssen, kann FCS Endotoxine, Hämoglobin und andere Faktoren enthalten und eine potenzielle mikrobielle Kontaminationsquelle darstellen. [181,211,212] Dennoch bietet FCS die ideale Nährstoffgrundlage für viele Zelltypen, wodurch eine große Zeitersparnis in Bezug auf Entwicklung eines idealen Nährmediums für einzelne Zelllinien erreicht wird. [181]

Zur Untersuchung der Biodistribution wurden die Zellaufnahmestudien unter Zusatz von FCS zum DMEM-Medium mit ausgewählten Substanzen der jeweiligen Projektteile durchgeführt. Da die Proteinkonzentration durch FCS-Zugabe deutlich höher liegt, wurde für die Komplexe des Projektteil 1 (5-Substitution des Benzimidazols) die Zellaufnahme auch ohne Zugabe von FCS untersucht (siehe Kapitel 5.3.2). Hierbei lassen sich Unterschiede in der Zellaufnahme feststellen, wenn hohe Proteinbindungen vorliegen oder die Zellaufnahme über Proteine reguliert wird. Um weitere Aussagen über dieses Verhalten treffen zu können, wurden die Proteinbindungen von den Substanzen **3a-3f** bestimmt (siehe Kapitel 5.9). Darüber hinaus wurde die Zellaufnahme von Substanz **3b** unter Zugabe

von Apotransferrin untersucht (siehe Kapitel 5.7). Der Ligand **2d** und Komplex **3d** zeichnen sich in der Struktur durch ein organisch-gebundenes Fluoratom am Benzimidazol aus, welches mittels MAS-Methode im Zellmaterial detektiert werden konnte (siehe Kapitel 5.8).

5.3 Zellaufnahmestudien von substituierten Benzimidazol-Ruthenium(II)-Komplexen

5.3.1 Zellaufnahmestudien unter Zusatz von FCS

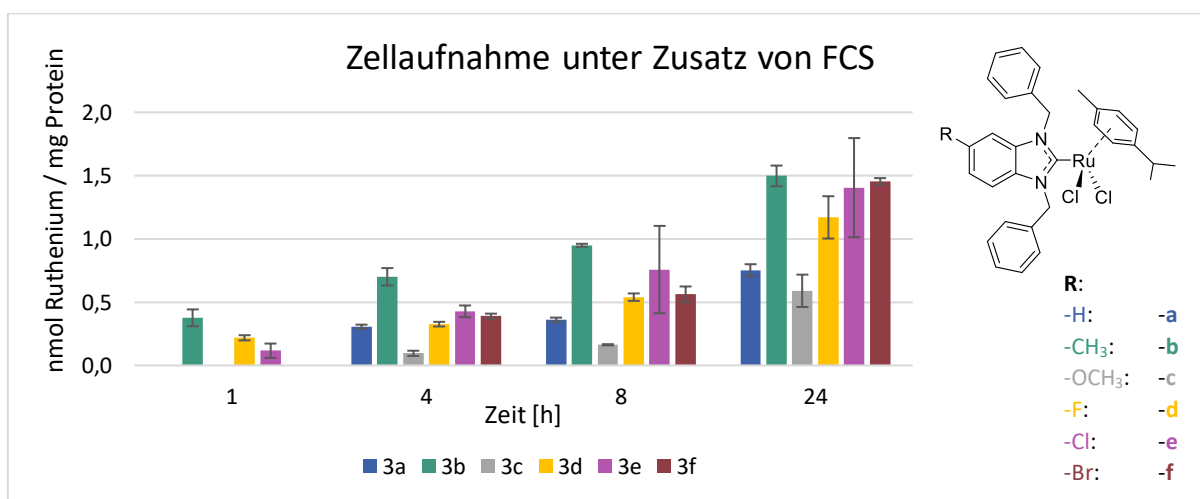


Abb. 71: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **3a-f** bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von 5 μM unter Zusatz von FCS zum Medium, $n = 3$.

Alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von 5 μM getestet. Es zeigt sich eine kontinuierliche Anreicherung des Rutheniums über den gesamten Zeitraum. Bei Substanzen **3a**, **3c** und **3e** kann nach 1 h kein Ruthenium detektiert werden. Der fluorierte Komplex **3d** wird stärker aufgenommen als der chlorierte Komplex **3e**. Der höchste Gehalt wird bei allen Substanzen nach 24 h gemessen, wobei der methylierte Komplex **3b** über den gesamten Zeitraum den höchsten Gehalt aufweist (ca. 1,5 nmol Ru / mg Protein nach 24 h) und **3c** mit Abstand den geringsten (ca. 0,6 nmol Ru / mg Protein). Die in der 5-Position halogenierten Komplexe zeigen eine ähnliche Zellaufnahme, wobei nach 24 h vom bromierten Komplex **3f** der höchste Metallgehalt ermittelt wird (ca. 1,45 nmol Ru / mg Protein). Allerdings wird ersichtlich, dass die Standardabweichungen von **3e** für den 8 h und 24 h Messzeitpunkt sehr hoch liegen. Bei biologischen Testverfahren dieser Art ist eine etwas höhere Standardabweichung zwar tolerierbar, da durch Pipettieren kleiner Volumina und durch die vielen Arbeitsschritte über Probennahme, Ermittlung des Proteingehaltes über einen Bradfordassay und letztendlich Bestimmung des Metallgehaltes mittels HR-CS-AAS Fehler schnell aufsummieren. Darüber hinaus arbeitet man mit

Zellen, deren Wachstum Schwankungen mit sich bringt. Jedoch erwiesen sich die überdurchschnittlich hohen Schwankungen der Messergebnisse von **3e** als problematisch, da auch bei wiederholter Durchführung des Versuchs keine kleinere Standardabweichung erreicht werden konnte. Aus diesem Grund lässt sich nicht klar entscheiden, welche Halogenkomplexe sich am stärksten in der Zelle anreichern.

5.3.2 Zellaufnahmestudien ohne Zusatz von FCS

Die Zellaufnahme der Komplexe **3a-f** wurde zusätzlich unter Ausschluss von FCS bei einer Substanzkonzentration von 5 μM untersucht. Auch in diesem Experiment zeigt sich eine Anreicherung von Ruthenium in der Zelle innerhalb der Inkubationszeit von 24 h, die mit Ausnahme der Komplexe **3a** und **3c** jedoch deutlich höher liegt als beim Versuch mit Zugabe von FCS.

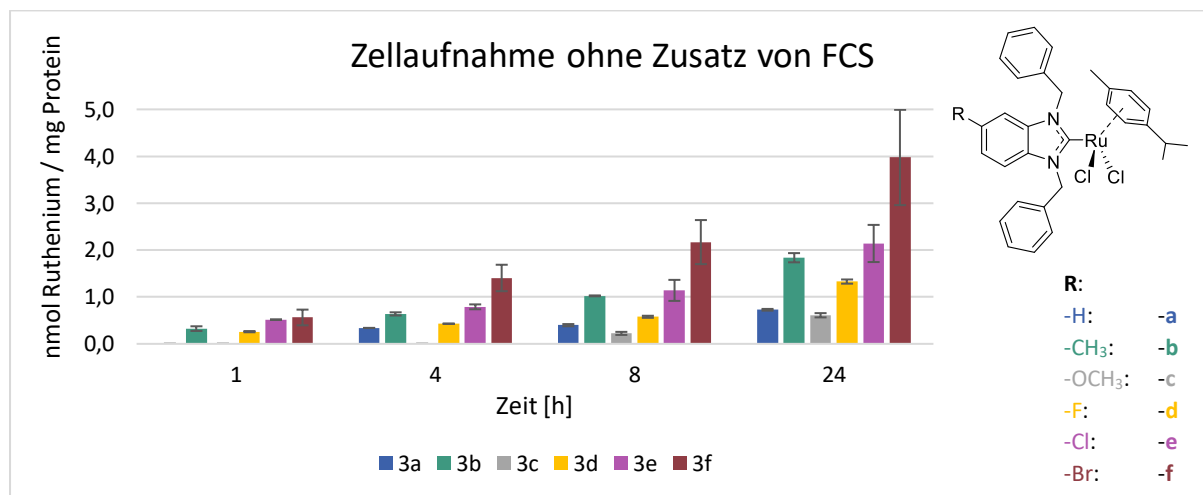


Abb. 72: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **3a-f** bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von 5 μM ohne Zusatz von FCS zum Medium, $n = 3$.

Der Komplex **3c** wird über den gesamten Zeitraum am wenigsten in die Zelle aufgenommen. Diesmal lässt er sich erst nach 8 h detektieren und auch nach 24 h liegt mit einem Gehalt von ca. 0,6 nmol Ru / mg Protein der niedrigste Rutheniumgehalt vor. Der größte Unterschied wird bei den halogenierten Komplexen **3d-f** ersichtlich, wobei **3f** sich über die Zeit am stärksten in der Zelle anreichert. Während der Komplex nach 1h unter FCS Zugabe noch nicht detektierbar ist, liegt bei diesem Experiment zum gleichen Zeitpunkt bereits ein Gehalt von 0,5 nmol Ru / mg Protein vor. Nach 24 h wird mit 3,97 nmol Ru / mg Protein der Komplex 2,5-fach stärker in die Zellen aufgenommen als mit 1,45 nmol Ru / mg Protein unter FCS Zugabe. Vergleicht man die halogenierten Komplexe

untereinander, zeigt der Komplex mit Fluor-Substituent **3d** eine schlechtere Zellaufnahme als der chlorierte Komplex **3d** und bromierte Komplex **3f**.

5.4 Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Imidazolgrundkörper

Auch die Metallkomplexe mit Imidazolgrundkörper wurden in Zellaufnahmestudien unter Zugabe von FCS untersucht. Der IC_{50} -Wert an MCF7-Zellen liegt mit $> 100 \mu\text{M}$ für **3g** und ca. $24 \mu\text{M}$ für **3h** deutlich höher als die bisher vermessenen Verbindungen. Dennoch wurde, um den Vergleich in der Zellaufnahme wahren zu können, nicht von der Inkubationskonzentration von $5 \mu\text{M}$ abgewichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 73 dargestellt. Zum Vergleich wurden auch die Messergebnisse der Zellaufnahme unter FCS Zugabe der Leitstruktur **3a** und der bromierten Variante **3f** mit abgebildet.

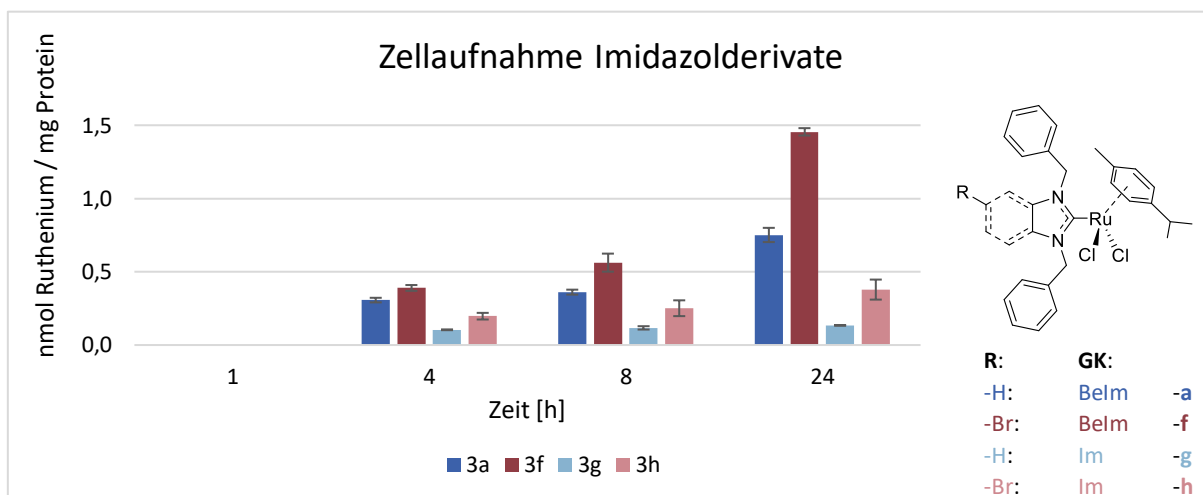


Abb. 73: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **3a**, **3f**, **3g** und **3h** bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von $5 \mu\text{M}$ mit Zusatz von FCS zum Medium, $n = 2$.

Nach einer einstündigen Inkubation lässt sich bei keiner Substanz Ruthenium detektieren. Der Gehalt steigt bis 24 h wieder deutlich an. Dabei fällt die Zellaufnahme bei den Imidazolderivaten deutlich geringer aus als bei den entsprechenden Komplexen mit Benzimidazolgrundkörper. Von den Bromsubstituierten Komplexen wird dabei ein deutlich höherer Metallgehalt gemessen. Der Benzimidazolkomplex **3f** wird mit $1,45 \text{ nmol Ru} / \text{mg Protein}$ 2-fach stärker in die Zelle aufgenommen als der unsubstituierte Komplex **3a**. Bei den Imidazolderivaten ist dieser Effekt noch stärker ausgeprägt. Nach 24 h akkumuliert der bromierte Komplex **3h** mit $0,37 \text{ nmol Ru} / \text{mg Protein}$ im Vergleich zum nicht substituierten Komplex **3g** mit $0,13 \text{ nmol Ru} / \text{mg Protein}$ 3-fach höher in der Zelle.

5.5 Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit unterschiedlichen Halogenido-Liganden

Zur Untersuchung der Auswirkung des Halogenidaustausches am Ruthenium(II)-Atom wurden die Zellaufnahme mittels der Komplexe **3b_{Br}** und **3b_I** bei einer Konzentration von 5 μM unter Zusatz von FCS zum Medium untersucht und die Ergebnisse dem Komplex **3b** mit Chlorido-Liganden gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind folgendem Diagramm zu entnehmen:

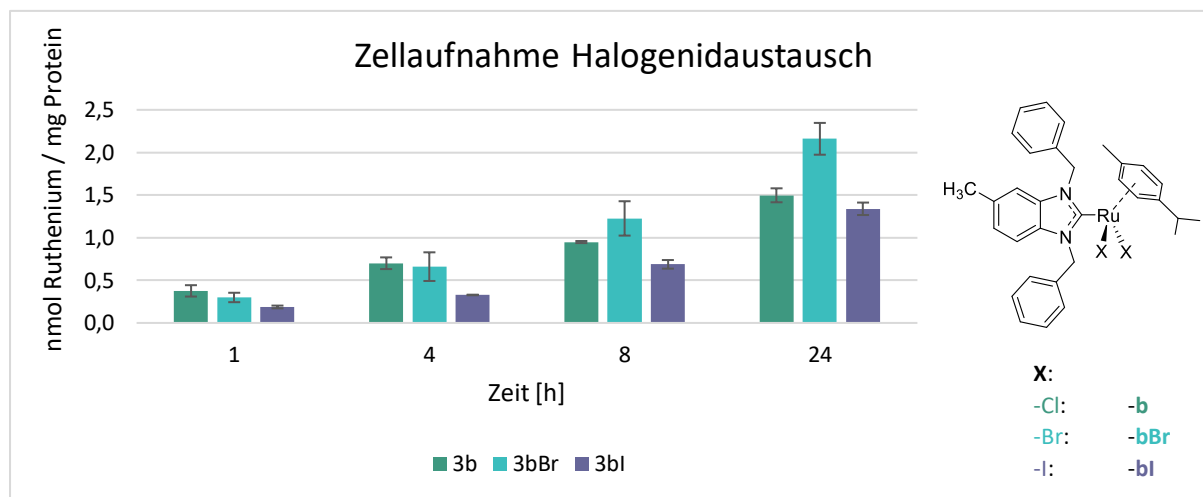


Abb. 74: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **3b**, **3b_{Br}** und **3b_I** bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von 5 μM mit Zusatz von FCS zum Medium, n = 2.

Auch in dieser Versuchsreihe zeigt sich eine Rutheniumakkumulation in den Zellen über 24 h. Der höchste Gehalt an Ruthenium wird bei allen Komplexen nach 24 h erreicht. Nach einer Stunde ist noch kein signifikanter Unterschied in der Zellaufnahme ersichtlich. Nach 4 und 8 h erkennt man, dass der iodierte Komplex **3b_I** deutlich geringer in die Zelle aufgenommen wird. Der größte Unterschied ist jedoch nach 24 h zu beobachten. Der bromierte Komplex **3b_{Br}** wird 1,5fach stärker in die Zelle aufgenommen (2,2 nmol Ru / mg Protein) als der iodierte Komplex **3b_I** (1,3 nmol Ru / mg Protein), welcher weniger stark in der Zelle akkumuliert als der chlorierte Komplex **3b** (1,5 nmol Ru / mg Protein).

5.6 Zellaufnahmestudien von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Pyrithion-Ligand

Auch die Pyrithion-Rutheniumkomplexe wurden in Zellaufnahmestudien untersucht. Die einzige Ausnahme in der Durchführung im Vergleich zu den bisherigen Testungen stellt die verwendete

Substanzkonzentration von 1 μM dar. Auch Komplex **3a** wurde für Vergleichszwecke bei dieser Konzentration getestet, genauso wie der Ausgangspyrithionkomplex **Pth-Ru**. Als Vergleich zu den bisherigen Versuchsreihen wird der Komplex **3a** in der ursprünglich verwendeten Konzentration von 5 μM mit abgebildet.

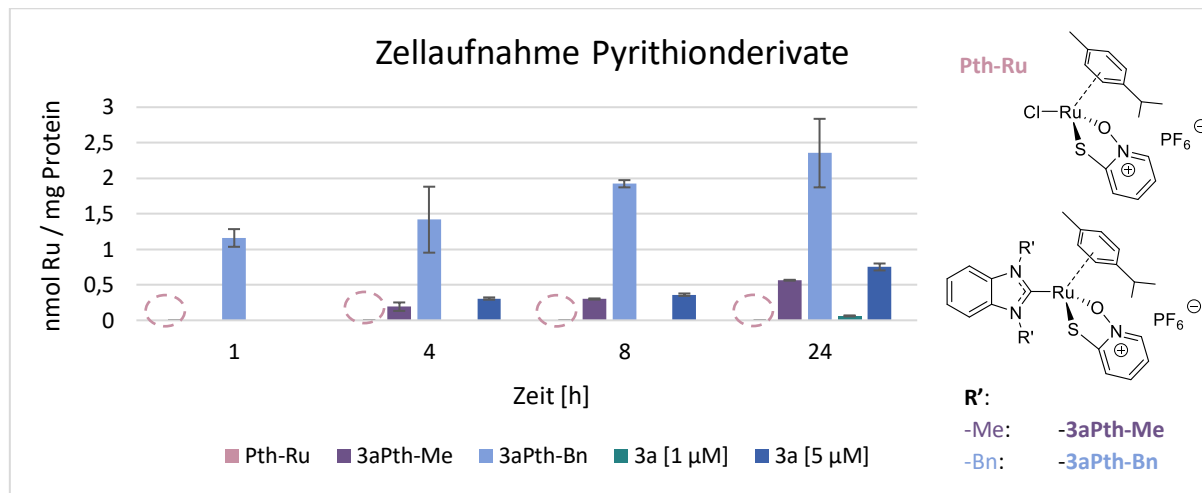


Abb. 75: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **Pth-Ru**, **3aPth-Me**, **3aPth-Bn** und **3a** bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von 5 μM , bzw. 1 μM mit Zusatz von FCS zum Medium, n = 2.

Die Substanzen zeigen deutliche Unterschiede in der Zellaufnahme. Nach 1 h kann außer bei **3aPth-Bn** kein Metall detektiert werden. Von dieser Substanz wird auch über den gesamten Zeitraum der größte intrazelluläre Gehalt an Ruthenium detektiert (ca. 2,4 nmol Ru / mg Protein nach 24 h) und wird im Vergleich zu **3a** deutlich verstärkt in die Zelle aufgenommen. Man könnte davon ausgehen, dass die stärkere Zellaufnahme mit der Ladung des Komplexes einhergeht. Allerdings wird der geladene Komplex **Pth-Ru** bei der vermessenen Konzentration über den gesamten Zeitraum gar nicht in die Zelle aufgenommen oder evtl. direkt wieder ausgeschleust. Zumindest kann kein Ruthenium detektiert werden (siehe violett gestrichelte Markierung, Abb. 75). Die methylierte Variante **3aPth-Me** kann erst nach 4 h bestimmt werden und liegt in gleicher Größenordnung wie die Zellaufnahme des Komplexes **3a** bei 5-fach höherer Konzentration (ca. 0,6 nmol Ru / mg Protein). Die äquimolare Konzentration von **3a** liefert nur eine sehr geringe Zellaufnahme bei einem Zeitpunkt von 24 h (ca. 0,1 nmol Ru / mg Protein). In bereits publizierten Studien von Oehninger et al. wurde der Komplex **3a** im Vergleich zu seinem Derivat mit Methylseitenketten an den Stickstoffen des Benzimidazolgrundkörpers untersucht. [126] Dabei zeigte sich, dass der methylierte Komplex nicht in die Zellen aufgenommen werden kann, vermutlich aufgrund fehlender Lipophilie. [126] Setzt man diese Ergebnisse mit den Daten der neuen Zellaufnahmestudien ins Verhältnis, wird ersichtlich, dass auch hier der methylierte Komplex **3aPth-Me** deutlich geringer in die Zelle aufgenommen wird als die benzylierte Variante **3aPth-Bn**. Jedoch zeigt der Austausch der Chlorido-Liganden gegen Pyrithion eine deutliche Steigerung der Zellaufnahme

im Vergleich zu den Ausgangsstrukturen **3a** und **3a-Me**. Auch unter Vorhandensein von Methylgruppen wird eine hohe Zellaufnahme erreicht. Dieser Ursache dieses Effekts kann jedoch nicht in der Ladung des Komplexes liegen, da Komplex **Pth-Ru** bei der verwendeten Konzentration keine Akkumulation von Ruthenium in der Zelle über den gesamten Zeitraum zeigt. Die Carben-Metallbindung scheint also einen positiven Effekt auf die Zellaufnahme auszuüben. Dieses Ergebnis verstärkt die Annahme, dass sich das Verhalten und die biochemischen Eigenschaften des Metallkomplexes über den NHC-Liganden steuern lassen.

5.7 Transferrin-vermittelte Zellaufnahmestudien

Die Wichtigkeit von Transferrin für den Organismus und die Diskussionen in der Forschung über einen möglichen Transferrin-vermittelten Transport von Ruthenium-Verbindungen wurden in Kapitel 1.4.3 schon deutlich herausgestellt. Auch für die neu synthetisierten Ruthenium(II)-NHC-Komplexe soll dieser Distributionsweg untersucht werden.

Als Leitsubstanz wurde der Komplex **3b** ausgewählt, da dieser in den Zellaufnahmestudien unter Zusatz von FCS zum Medium über den gesamten Inkubationszeitraum den größten Metallgehalt aufzeigt und für alle Inkubationszeiträume problemlos detektiert werden konnte. So können unter veränderten Versuchsbedingungen die Änderungen in der Zellaufnahme am besten dargestellt werden.

Es wurden verschiedene Bedingungen getestet, die an vorherige Versuche angelehnt sind. [135] Für **3b** wurde wie bei den anderen Versuchen eine Substanzkonzentration von 5 μM verwendet. Die Zugabe von Apotransferrin zum Medium wurde unter verschiedenen Konzentrationen untersucht (siehe Tab. 20).

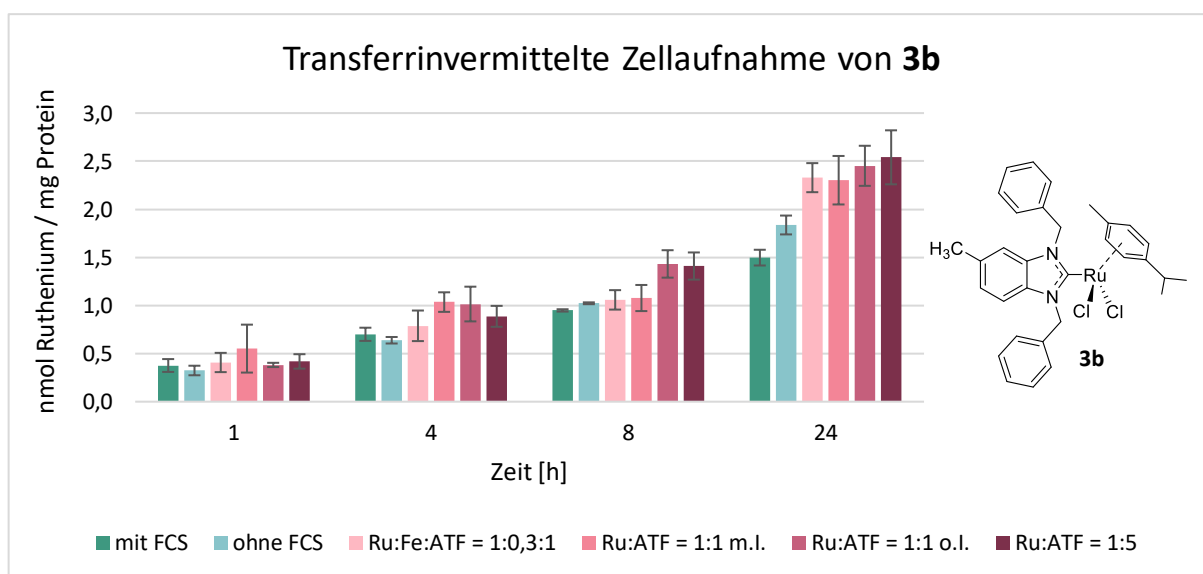
Nr.	Bedingung	Substanz- konzentration 3b	Supplemente	Apotransferrin- Konzentration	Vorinkubation
1	Ru:Fe:ATF	5 μM	FeCl ₃ (1,5 μM)	5 μM	ja
2	Ru:ATF = 1:1 m.I.	5 μM	-	5 μM	ja
3	Ru:ATF = 1:1 o.I.	5 μM	-	5 μM	-
4	Ru:ATF = 1:5	5 μM	-	25 μM	-

Tab. 20: Versuchsbedingungen für die Transferrin-vermittelten Zellaufnahmestudien von **3b**, m.I. mit Inkubation (von 2 h), o.I.: ohne Inkubation.

So wurde sowohl der Zusatz von 5 μM (äquimolare Menge Apotransferrin im Vergleich zur Substanz) und 25 μM (fünffache Menge an Apotransferrin im Vergleich zur Substanz) getestet, um zu beobachten, wie ein sehr großer Überschuss an Transferrin sich auf die Akkumulation des Rutheniums in der Zelle auswirkt. Unter der Bedingung 1 (Ru:Fe:ATF, siehe Tab. 20) wurde Eisen(III)-chlorid hinzugegeben. Dieses wird, wie bereits beschrieben, über Apotransferrin im Blut transportiert. Durch die Bindung des FeCl_3 an Apotransferrin tritt eine Konformationsänderung des Proteins ein und es bildet sich Transferrin aus. Die Idee hinter diesem Versuch war, eine Konformationsänderung des Proteins herbeizuführen und zu überprüfen, ob der Rutheniumkomplex unterschiedlich an das Transferrin gebunden und evtl. in einem anderen Maßstab in die Zelle aufgenommen wird. [135]

Dieses Experiment wurde von Pongratz et al. übernommen und beinhaltet das Vorhandensein von Apotransferrin im Medium (ohne Zellen) und eine Vorinkubation der Substanz von 2h. [135] Mit diesem Inkubationszeitraum wird garantiert, dass sich die Konformationsänderung ausbilden kann. Um zu überprüfen, ob bei dem Versuch die Vorinkubation einen Einfluss auf die Biodistribution hat, wurde unter Bedingung 2 die äquimolare Menge von Transferrin zum Komplex **3b** ohne Zugabe von FeCl_3 mit Vorinkubation getestet. Im Vorfeld durchgeführte Vortests der Zellaufnahmestudie von **3b** mit Vorinkubation (mit und ohne Zusatz von FCS zum Medium hatten darauf hingewiesen, dass die Vorinkubation keine Rolle für den aufgenommenen und gemessenen Metallgehalt in der Zelle spielt.

Die Ergebnisse der Zellaufnahme unter ATF Zugabe im Vergleich zu den bereits vorgestellten Ergebnissen unter Zugabe und Ausschluss von FCS von Komplex **3b** sind in der Abb. 76 dargestellt.



Auch bei diesem Experiment zeigt sich der Anstieg der Rutheniumkonzentration innerhalb von 24 h bei allen Proben. Deutlich wird aber, dass unter jeglicher ATF-Zugabe der Rutheniumgehalt deutlich angestiegen ist. Nach 1 h und 4 h ist dieser Effekt noch nicht zu beobachten, erste Tendenzen werden nach 8h ersichtlich. Aber nach spätestens 24 h ist ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Hierbei spielt es keine Rolle unter welcher Konzentration Apotransferrin dem Medium hinzugegeben wurde. Auch Eisen(III)-chlorid als potenzieller Wirkverstärker oder die Vorinkubation scheint keinen Einfluss auf die Zellaufnahme zu besitzen. Aber im Vergleich zum ATF-freien Medium mit oder ohne FCS zeigt sich eine deutlich erhöhte Zellaufnahme, die bei 24h mit einer 1,5-fach höheren Zellaufnahme von ca. 1,5 nmol Ru / mg Protein auf ca. 2,5 nmol Ru / mg Protein ihr Maximum erreicht. Man kann an dieser Stelle noch nicht sagen, ob Ruthenium über einen dem Eisen-Stoffwechsel analogen Weg transportiert und evtl. auch metabolisiert wird. Jedoch lässt sich festhalten, dass Apotransferrin einen positiven Einfluss auf die Zellaufnahme von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen besitzt.

5.8 Bestimmung der intrazellulären Fluorkonzentration

Die bisherigen Zellaufnahmestudien zeigen wieviel Ruthenium in die Zelle gelangt und dort akkumuliert. Da aber das reine Metall detektiert wird, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob der Komplex auf dem Weg in die Zelle intakt und stabil bleibt, oder ob Teile der Strukturen metabolisiert oder hydrolysiert werden. Daher ist die Fluor-Messung mittels AAS eine besondere Methode, um weitere Einblicke in den Metabolismus der Komplexe zu erhalten. So können Aussagen getroffen werden, ob der Komplex vollständig in die Zelle gelangt und in welchem Verhältnis Fluor zu Ruthenium in die Zelle aufgenommen wird. So konnten Schmidt et al. anhand von Bis-NHC-Goldkomplexen, die als Grundkörper ein 5-Fluorbenzimidazol enthielten, zeigen, dass Fluor zu Beginn der Messung 2,5-fach höher als Gold in der Zelle akkumulierte. Während Gold langsam aus der Zelle ausgeschleust wurde, blieb der Fluorgehalt über die Inkubationszeit nahezu konstant. [197]

Um dies auch für die neu synthetisierten Ruthenium-Komplexe nachzuvollziehen, wurde die intrazelluläre Fluor-Konzentration des Liganden **2d** und Komplexes **3d** mittels HR-CS-AAS-MAS bestimmt. [213] Diese Methode beruht auf der Bildung von gasförmigen diatomaren Molekülen. [197] Dabei wird das Fluor indirekt über die Bildung von GaF bestimmt, welches durch die Zugabe von Gallium(III)-nitrat zur Probelösung dann folglich während der Atomisierung gebildet wird. Das in Ligand **2d** und Komplex **3d** organisch gebundene Fluor an der 5-Position des Benzimidazols wird durch Erhöhung der Temperatur freigesetzt und bildet in der Gasphase Galliummonofluorid, welches bei 211,2480 nm detektiert werden kann. [214] Zuvor erfolgten eine gründliche Reinigung des Geräts und

frische Herstellung aller notwendigen Reagenzien, ehe mit der Messung begonnen werden kann, um auch kleinste Spuren von Fluor zu entfernen.

Als Modifier dient bei dieser Methode eine 0,05 mm dicke Tantal-Folie, mit der das Graphitrohr genau ausgekleidet wird. [213] Claudia Schmidt verzeichnete bereits, dass dieser Schritt maßgebend für eine gute Reproduzierbarkeit der Messung ist. Bereits bei kleinen Rissen in der Folie steigt der Blindwert signifikant an. [203] Die Folie bietet im Vergleich zu anderen Modifiern den Vorteil eines fluorfreien Modifiers, da viele Lösungen nicht standardgemäß auf den Fluorgehalt geprüft werden und was häufig in großen Blindwerten resultiert. [203]

5.8.1 Vermessen des Fluor-Gehaltes der Zellaufnahme von **3d**

Um Rückschlüsse auf die Stabilität des Komplexes während der Zellaufnahme zu ziehen, wurde der Fluor-Gehalt des Komplexes **3d** vermessen. Bereits bei der Kalibrierung zeigte sich, dass die Sensitivität der Bestimmung von Fluor im Vergleich der meisten Metalle deutlich niedriger ausfällt.

Die Messung erfolgt im ersten Schritt über die Bestimmung des Blindwertes, in dem Reinstwasser mit einer frisch hergestellten Triton-Lösung vermessen wird. Wenn die Bestimmung konstante Werte liefert, kann mit der Vermessung der Kalibrierung fortgefahren werden.

Die Messpunkte von Reinstwasser und der ersten Kalibrierungspunkte sind in der Abb. 77 genauer dargestellt. Die Kalibrierungspunkte von 1 μM und 1,5 μM überschneiden sich mit ihren Fehlerbalken von denen des Blindwertes (RW: Reinstwasser). Erst ab 2 μM ist das nicht mehr der Fall.

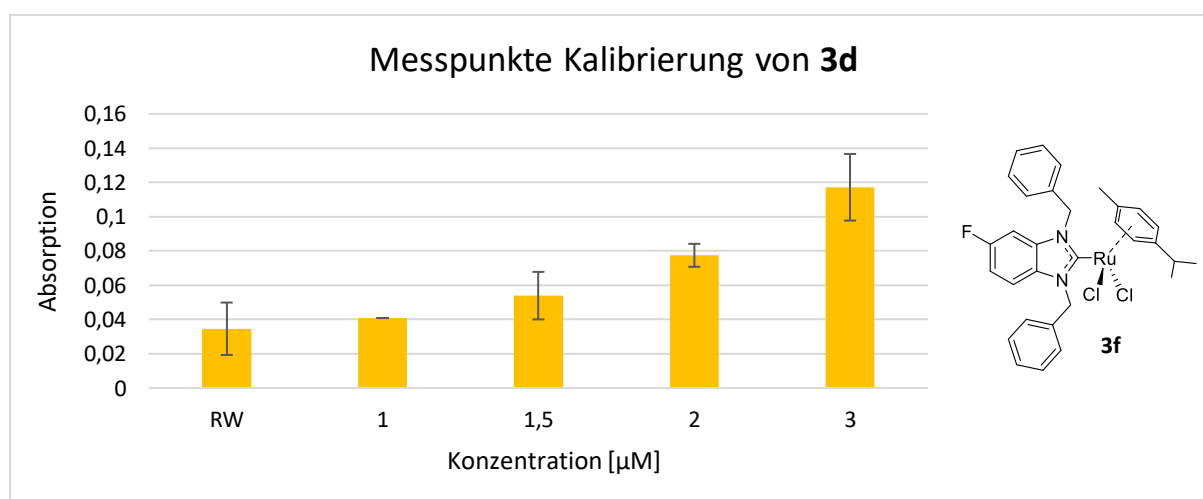


Abb. 77: Gemessene Absorptionen von GaF mittels HR-CS-AAS bei unterschiedlichen Konzentrationen von **3d** im Vergleich zu Reinstwasser (RW).

Rechnerisch kann die Nachweisgrenze ermittelt werden, in dem der Mittelwert der 10-fachen Vermessung einer Blindprobe (in diesem Fall RW) mit der dreifachen Standardabweichung addiert wird. [215] Für die Nachweisgrenze ergibt sich in diesem Fall eine Absorption von 0,08, welche rechnerisch einer Konzentration von 2,06 μM von **3d** entsprechen würde.

Leider ergab die Messung der Proben, dass über den gesamten Inkubationszeitraum von 1, 4, 8 und 24 h der Gehalt an Fluor unter 2 μM und damit unter der Detektionsgrenze liegt. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Medium zuvor mit FCS versetzt wurde oder die Proben unter Ausschluss von FCS gewonnen wurden. Ob der Ligand vor Aufnahme in die Zelle hydrolysiert wird und deshalb nur das Metall detektiert werden kann, weil der Ligand vorher abgespalten wird, lässt sich an dieser Stelle nicht beurteilen. Wahrscheinlicher ist es, dass aufgrund des zuvor bestimmten sehr niedrigen Metallgehaltes, der Gehalt an **3b** in der Zelle zu gering ist, als dass man den Fluorgehalt messen könnte.

Wenn man von der Detektionsgrenze von 2,06 μM ausgeht und der Probe diesen Gehalt nach 24 h zuschreibt, dann würde das einer Konzentration von 1,37 nmol Fluor / mg Protein entsprechen. **3d** wurde unter Zugabe von FCS nach 24 h Inkubationszeit ein Wert von 1,17 nmol Ruthenium / mg Protein ermittelt (siehe Abb. 71). Es kann also sein, dass die Metall-Carbenbindung während der Zellaufnahme intakt bleibt und der NHC-Ligand nicht abgespalten wird. Aufgrund der niedrigen Detektionsgrenze und dem nicht sehr sensitiven Verfahren der Fluor-Messung ist dennoch keine Detektion möglich. Allerdings kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, dass es zu einer Abspaltung und vermehrten Anreicherung des NHC-Liganden in der Zelle kommt.

5.8.2 Vermessen des Fluor-Gehaltes der Zellaufnahme von **2d**

Mit derselben Methode wurde auch der Ligand **2d** vermessen, um zu beurteilen, ob die NHC-Liganden in die Zelle aufgenommen werden können. Schließlich zeigen sie antiproliferative und Apoptose-induzierende Eigenschaften (siehe Kapitel 4.1 ff.).

Hingegen zum Komplex **3d** konnte für den Liganden **2e** nach 24 h der Fluor-Gehalt ermittelt werden (siehe Abb. 78).

Jedoch lassen sich die beiden Messwerte schlecht miteinander vergleichen. Aufgrund der ionischen Struktur von **2d** werden andere Transportprozesse als bei **3d** zugrunde liegen. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die Liganden in nennenswerten Mengen in die Zelle gelangen und deshalb einen Einfluss auf die Zytotoxizität besitzen, wie es anhand der fluorierten Variante **2d** durch diese Methode beispielhaft gezeigt werden konnte.

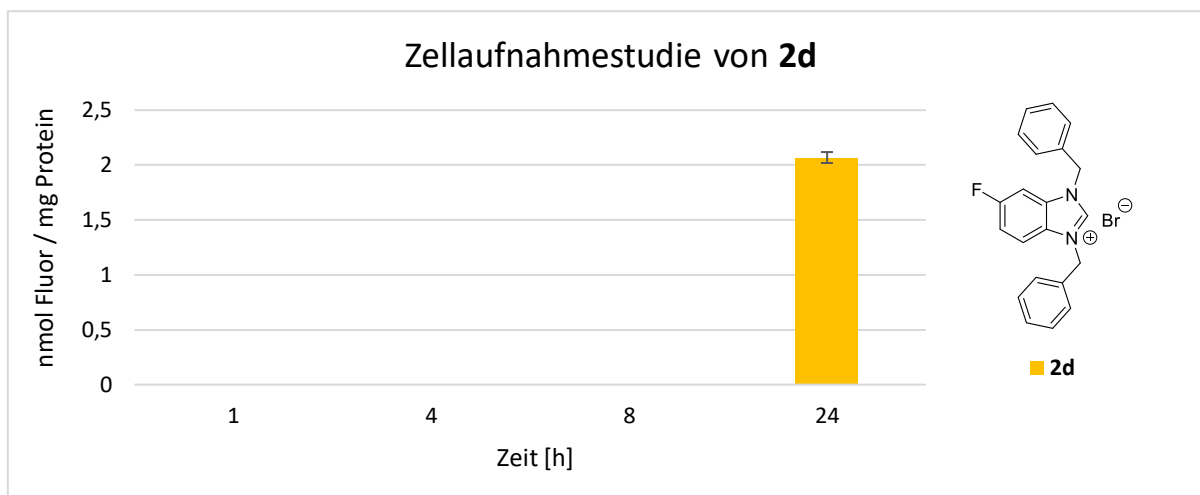


Abb. 78: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen von **2d**, bei einer eingesetzten Substanzkonzentration von 5 μM mit Zusatz von FCS zum Medium, Bestimmung der intrazellulären Fluorkonzentration, $n = 2$.

5.9 Proteinbindungsstudien

Proteinbindung ist ein wichtiger Parameter für die Arzneimittelentwicklung, da sich diese Eigenschaft über die ganze Zellaufnahme und Distribution des Arzneistoffs im Organismus auswirkt. Viele Arzneistoffe haben die Fähigkeit mit hoher Affinität an Albumin zu binden, wodurch die freie Wirkstoffkonzentration im Blut geringer ausfällt, was sich letztendlich auf die Dosisbestimmung auswirkt. [216]

FCS enthält verschiedene Proteine, darunter auch Albumin. [181] Um die bisherigen Zellaufnahmestudien unter verschiedenen Bedingungen besser bewerten zu können, wurden Proteinbindungsstudien an BSA als Vergleichsprotein durchgeführt. Die Zeitpunkte der Messung sind an die Zellaufnahmestudien angelehnt. Bereits in vorherigen Studien hat sich gezeigt, dass die Proteinbindung sich sehr schnell einstellt, weshalb diese bereits nach 0 h und nur bis zu einem Zeitpunkt von 4 h bestimmt wurden. [126] Die Methode beruht auf der Ethanolpräzipitation. [217] Die Proteine, die evtl. an die Rutheniumkomplexe gebunden vorliegen, werden ausgefällt, abzentrifugiert und anschließend der Metallgehalt im Überstand mittels HR-CS-AAS vermessen. Während der Probenvorbereitung hat sich gezeigt, dass die Zentrifugation keinen unerheblichen Einfluss auf die Ergebnisse darstellt. Bei einer verwendeten Zeit von 5 min war der Metallgehalt im Überstand so hoch, dass keine Proteinbindung ermittelt werden konnte. Die vorgestellten Ergebnisse beruhen auf Zentrifugation bei 4800 rpm (1853 g) für 10 min bei 4°C. Da die Probelösung ethanolisch vorliegt, müssen die Proben während der AAS-Messung zeitnah vermessen werden. Zu lange Wartezeiten zwischen Probenvorbereitung für die AAS-Messung und eigentliche Messung führen zu

Verdunstungseffekten in den Vials und Aufkonzentrierung der Probe. Dadurch resultiert ein zu hoher Metallgehalt im Überstand und daraus eine zu geringe Proteinbindung.

Die Studien wurden erneut mit den Substanzen **3a** – **3f** des Hauptprojektes durchgeführt. Bei allen Komplexen steigt die Proteinbindung über den Zeitraum leicht an, nur bei Komplex **3f** wird nach 0 h die höchste Proteinbindung erreicht, welche dann nach 4 h wieder leicht abnimmt. Die größte Bindung zeigen die halogenierten Komplexe **3d-3f**, wobei Komplex **3e** über den gesamten Zeitraum die höchste Proteinbindung besitzt. Diese Ergebnisse korrelieren z.T. mit den Zellaufnahmestudien ohne Zugabe FCS, da auch hier die größte Zellaufnahme mit den halogenierten Komplexen erreicht wurde. Aufgrund einer erhöhten Proteinbindung wird eine größere Zellaufnahme unter Abwesenheit von FCS als unter Zugabe von FCS erreicht, welches sich durch eine starke Bindung an die Komplexe negativ auf die Zellaufnahme auswirkt. Auch Komplex **3c**, der bei beiden Zellaufnahmestudien einen sehr geringen Rutheniumgehalt aufwies, zeigte im Vergleich zu den anderen Komplexen eine höhere Proteinbindung mit knapp unter 20 %. Hingegen erreicht Komplex **3b** die niedrigste Proteinbindung mit knapp 11 % nach 4 h. Dieser Komplex wurde auch über einen längeren Zeitraum getestet (nicht in der Graphik abgebildet) und auch nach 8 h lag die Proteinbindung um die 11 %. Diese sehr geringe Proteinbindung erklärt, weshalb der Rutheniumgehalt unter FCS Zugabe und Ausschluss sich kaum verändert und zu gleichmäßig hoher Zellaufnahme im Vergleich zu den anderen Komplexen führt.

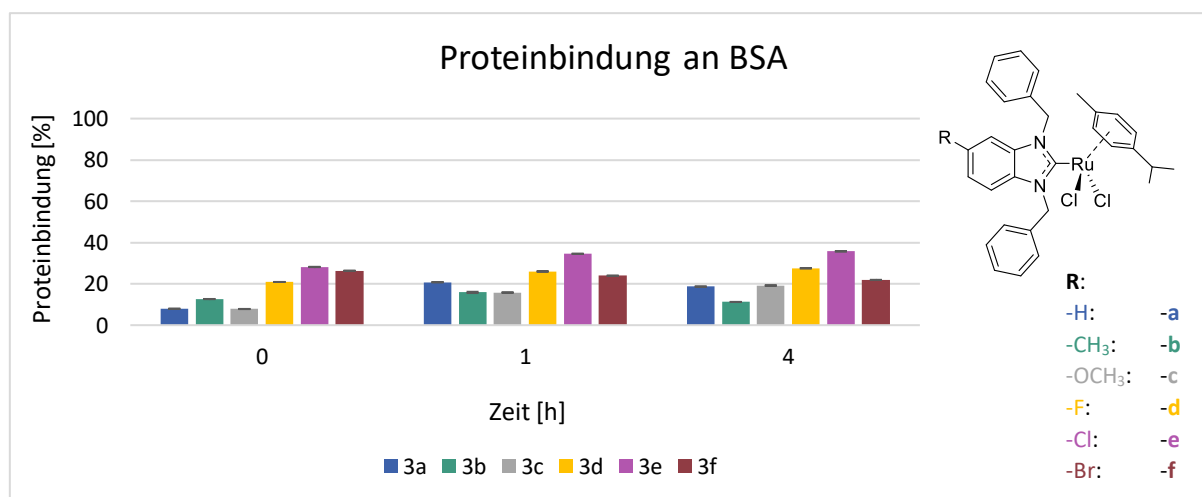


Abb. 79: Proteinbindung (%) von **3a-3f** an BSA bei einer eingesetzten Substanzkonzentration 5 μ M, n = 2.

Die Rutheniumkomplexe zeigen mäßige Proteinbindungen mit bis zu ca. 35 %. Im Vergleich zu anderen Komplexen fallen die Proteinbindungen deutlich geringer aus. So wurde von **3a** in vorangegangenen Messungen eine dreifach so hohe Proteinbindung von ca. 65 % gemessen. [126] Die Abweichung könnte auf unterschiedliche BSA-Chargen zurück zu führen sein. Dennoch wird deutlich, dass das

Proteinbindungsverhalten von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen nicht so stark ausgeprägt ist, wie z.B. von Gold-NHC-Komplexen. Bei diesen wurden bereits Bindungen von > 90 % detektiert. [138] Diese Ergebnisse könnte man erneut anhand des HSAB-Konzeptes erklären (siehe Kapitel 4.5.5).

5.10 Zusammenfassung

Es wurden verschiedene Zellaufnahmestudien erfolgreich durchgeführt und analysiert. Daraus lassen sich die potentesten Strukturmerkmale der Ruthenium-Komplexe ableiten (siehe Abb. 80). Als Grundlage dienen hier vor allem die Messwerte nach 24 h Inkubationszeit.

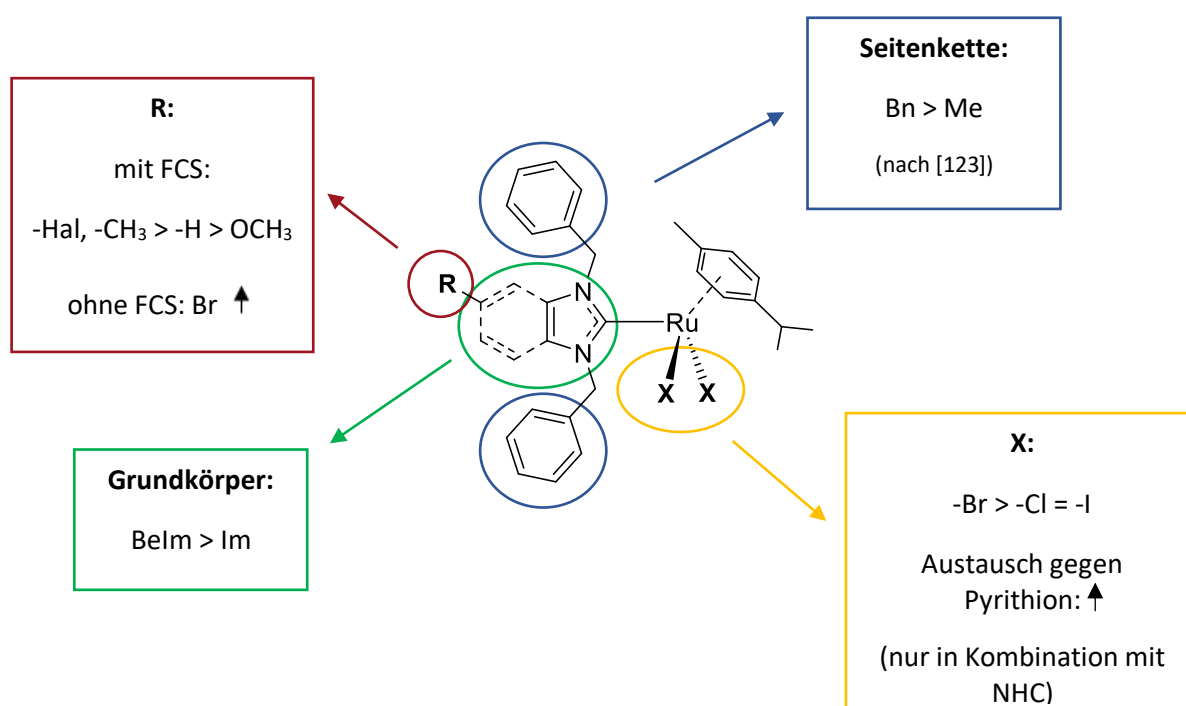


Abb. 80: Mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe auf Grundlage der Zellaufnahmestudien.

In Hinblick auf die Anreicherung in der Zelle zeigt sich der Benzimidazol- dem Imidazolgrundkörper überlegen. Die Zellaufnahme kann durch Substituenten wie Halogene oder Methylgruppen an der 5-Position gesteigert werden. Verwendet man serumfreies Medium für die Versuche, dann stellt der Rutheniumkomplex mit Bromsubstituent **3f** die potenteste Struktur dar. Die lipophilen Seitenketten, wie Benzylreste, erhöhen die Zellaufnahme. Der Austausch der Chlorido- gegen Bromido-Liganden am Ruthenium(II)-Atom führt zu einer stärkeren Anreicherung in der Zelle. Der Austausch der Chlorido- gegen Bromido-Liganden am Ruthenium(II)-Atom führt zu einer stärkeren Anreicherung in der Zelle. Der Austausch gegen Iodido-Liganden zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied. Allerdings

resultiert der Austausch gegen Pyrrithion in einer starken Erhöhung der Zellaufnahme, welche lediglich dann auftritt, wenn **Pth-Ru** organometallisch an einen NHC-Liganden gebunden vorliegt.

Darüber hinaus wird die Zellaufnahme positiv beeinflusst, wenn Apotransferrin im Medium enthalten ist, wie beispielhaft an Substanz **3b** gezeigt werden konnte. Die Apotransferrinkonzentration zeigte dabei keinen Einfluss auf die Zellaufnahme. Ob Apotransferrin als Carrier fungiert und die Ruthenium-Komplexe analog zum Eisenstoffwechsels transportiert und evtl. auch metabolisiert werden, kann an dieser Stelle nicht genauer definiert werden.

Die Benzimidazoliumbromide werden vermutlich in die Zelle aufgenommen. Dies konnte zumindest anhand der Zellaufnahme von Ligand **2d** und Detektion der intrazellulären Fluorkonzentration mittels AAS-MAS gezeigt werden. Der korrespondierende Komplex **3d** wird vermutlich in so geringen Mengen in die Zelle aufgenommen, dass diese unterhalb der Nachweisgrenze von 1,37 nmol Fluor / mg Protein liegen. Jedoch kann im Ausschlussverfahren festgehalten werden, dass sich der Ligand als Hydrolyseprodukt des Komplexes nicht in großen Mengen in der Zelle anreichert.

6. Antibakterielle Eigenschaften

Eine weitere Gruppe der Chemotherapeutika stellen die Antibiotika dar. Da bereits die Inhibition der Säugetier-TrxR durch Ruthenium(II)-NHC-Komplexe bestätigt werden konnte, wurde die Forschung auf die Interaktion mit der TrxR in Bakterienzellen (*E.coli*-TrxR) ausgeweitet.

Die bioanalytische Evaluierung der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe für den Einsatz als Antibiotikum kann widersprüchlich aufgefasst werden, da bei einer antibiotischen Therapie keine zytotoxische Wirkungsweise gewünscht ist. Es gibt aber einige Stoffgruppen, die sowohl als Antibiotikum, als auch Zytostatikum fungieren können. So gibt es die Gruppe der zytostatisch wirkenden Antibiotika, welche aufgrund ihres Verhaltens nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen, sondern als Zytostatikum eingesetzt werden. [88] Zu dieser Gruppe gehören u.a. die Anthrazykline Doxo- und Daunorubicin, die bereits in Kapitel 4.4 vorgestellt wurden.

Die alleinige Enzyminteraktion ist nicht ausreichend aussagekräftig, wenn man nur Ergebnisse auf enzymatischer Ebene besitzt und keinen Bezug auf die Auswirkung in den Bakterienstämmen ziehen kann. Daher wurden die Substanzen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Julia Bandow an der Ruhr-Universität in Bochum an verschiedenen Bakterien- und Fungi-Stämme in einem Mikroboullion-Verdünnungstest bestimmt, um fundiertere Aussagen über die neu synthetisierten Substanzen hinsichtlich ihrer antibakteriellen Eigenschaften und ihrer Auswirkungen auf die verschiedenen Bakterienstämme treffen zu können. Da dabei vorrangig grundlegende Mechanismen der antibakteriellen Wirksamkeit von Ruthenium(II)-NHC-Komplexen und deren Liganden untersucht werden sollten, wurden die Testungen auf die Substanzen des Hauptprojektes (Modifikation der 5-Position des Benzimidazols) eingegrenzt. Damit wurden die Testungen nur an den Liganden **2a-f** und Komplexen **3a-f** durchgeführt.

6.1 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC)

Für die Versuche wurden die gram-positiven Bakterienstämme *Bacillus subtilis* (168 DSM 402), *Staphylococcus aureus* (DSM 20231), *S.aureus* (ATCC 43300), die gram-negativen Bakterienstämme *Escherichia Coli* (DSM 30083), *Acinetobacter baumannii* (DSM 30007), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071) und die Pilzart *Candida albicans* (DSM 1386) verwendet. Diese werden den Substanzen, von denen unterschiedliche Verdünnungen hergestellt wurden, ausgesetzt und 16 h inkubiert. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) stellt die geringste Substanzkonzentration dar, die sichtbares Bakterienwachstum inhibiert. Verwendet wurde ein Konzentrationsbereich von 0,5 µg / mL – 512 µg / mL. Wurde auch bei der höchsten Konzentration von 512 µg / mL keine sichtbare Inhibition des

Bakterienwachstums festgestellt, wurde der MIC-Wert in $> 512 \mu\text{g} / \text{mL}$ angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit sind die Ergebnisse in μM (siehe Tab. 21 und Tab. 22.) dargestellt.

Als Referenz dient die Messung von DMF an den unterschiedlichen Erregerstämmen, welches als Lösemittel für die Substanzen diene.

Verwendet wurden zwei verschiedenen *S.aureus* Stämme. Bei dem ATCC 43300 handelt es sich um einen Methicillin- und Oxacillin-resistenten Stamm (MRSA). [218] Methicillin spielt heutzutage keine wichtige Rolle mehr, ist dennoch namensgebend für den Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stamm (MRSA), welche Resistenzen gegen alle Beta-Lactam-Antibiotika ausgebildet hat. Im Krankenhaus stellt der häufige Antibiotikaeinsatz einen Selektionsdruck dar, wodurch es zur häufigen Ausbreitung der MRSA-Stämme und damit einhergehenden Problematiken im Krankenhaus kommt. [219,220] Die Behandlung wird mit Notfallantibiotika wie Vancomycin oder Linezolid durchgeführt. [88] Jedoch stellen die MRSA-Keime nicht mehr die bedrohlichsten Keime dar. Die Liste der besorgniserregendsten Stämme führen die gram-negativen Stämme *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* an, gegen die die WHO mit hoher Dringlichkeit neue Antibiotika fordert. [221]

Substanz	gram -			gram +			fungi
	<i>E.coli</i> DSM 30083	<i>A.baumannii</i> DSM 30007	<i>P.aeruginosa</i> DSM 50071	<i>B.subtilis</i> 168 DSM 402	<i>S.aureus</i> DSM 20231	<i>S.aureus</i> ATCC 43300	<i>C.albicans</i> DSM 1386
2a	1349,9	1349,9	1349,9	168,7	42,2	42,2	1349,9
2b	1301,7	1301,7	1301,7	650,9	81,4	162,7	1301,7
2c	1250,8	1250,8	1250,8	78,2	19,5	19,5	1250,8
2d	1288,7	>1288,7	>1288,7	322,2	161,1	161,1	>1288,7
2e	1242,6	1242,6	1242,6	155,3	77,7	77,7	1242,6
2f	>1117,4	>1117,4	>1117,4	279,4	139,7	69,8	>1117,4
DMF	7005	7005	7005	7005	7005	7005	7005

Tab. 21: Die minimale Hemmkonzentration in μM der Substanzen **2a-2f**, bzw. der Kontrolle (DMF).

Die Ergebnisse des Mikroboullion-Verdünnungstests zeigen, dass DMF als Negativkontrolle keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum an den unterschiedlichen Erregerstämmen hat. Auch alle Benzimidazoliumbromide **2a-2f** üben keinen Effekt auf das Wachstum der drei gram-negativen Stämme oder des Pilzstammes *Candida albicans* aus. Jedoch werden an den gram-positiven Stämmen Hemmkonzentrationen im mikromolaren Bereich erreicht. Bei *B.subtilis* sind diese noch deutlich

erhöht ($>100\ \mu\text{M}$), nur Ligand **2c** kann einen Wert von ca. $78\ \mu\text{M}$ erreichen. Bei den beiden *S.aureus* Stämmen werden mit bis zu $19\ \mu\text{M}$ der Substanz **2c** jedoch deutlich niedrigere Ergebnisse erzielt. Besonders bemerkenswert ist, dass die größte Aktivität am MRSA-Stamm *S.aureus* ATCC festzustellen ist. Der Ligand **2c** ist an allen gram-positiven Stämmen am aktivsten, gefolgt von dem nicht-substituierten Ligand **2a**. Die anderen Liganden sind auch an den gram-positiven Stämmen weit weniger aktiv, mit MIC-Konzentrationen $>100\ \mu\text{M}$ bei Ligand **2b** und **2d**.

Substanz	gram -			gram +			fungi
	<i>E.coli</i> DSM 30083	<i>A.baumannii</i> DSM 30007	<i>P.aeruginosa</i> DSM 50071	<i>B.subtilis</i> 168 DSM 402	<i>S.aureus</i> DSM 20231	<i>S.aureus</i> ATCC 43300	<i>C.albicans</i> DSM 1386
3a	$>846,9$	423,4	211,7	52,9	26,5	26,5	$>846,9$
3b	827,7	413,8	413,8	25,9	25,9	25,9	$>827,7$
3c	$>806,8$	$>806,8$	$>806,8$	25,2	25,2	25,2	$>806,8$
3d	822,4	205,6	$>822,4$	25,7	25,7	25,7	$>822,4$
3e	401,2	$>802,4$	$>802,4$	25,1	25,1	12,5	$>802,4$
3f	374,6	$>749,1$	$>749,1$	11,7	23,4	11,7	$>749,1$
DMF	7005	7005	7005	7005	7005	7005	7005

Tab. 22: Die Minimale-Hemmkonzentration in μM der Substanzen **3a-3f**, bzw. der Kontrolle (DMF).

Mit den Ruthenium(II)-NHC-Komplexen werden ähnliche Ergebnisse erzielt. Die Substanzen sind deutlich inaktiver an den gram-negativen Stämmen. Jedoch liegen die MIC-Konzentrationen in Bereichen von $400 - 800\ \mu\text{M}$ und damit schon deutlich niedriger als noch bei den Liganden **2a-2f**. Mit Komplex **3a** wird am Stamm *P.aeruginosa* und mit **3d** am Stamm *A.baumannii* MIC-Konzentrationen von ca. $200\ \mu\text{M}$ erreicht.

Deutlich resolutere Ergebnisse liefern die Rutheniumkomplexe an den gram-positiven Stämmen. Alle Komplexe weisen MIC-Konzentrationen um die $25\ \mu\text{M}$ auf. Die aktivste Substanz stellt der bromierte Komplex **3f** dar, mit einer Aktivität von $11,7\ \mu\text{M}$ an *B.subtilis* und am MRSA-Stamm *S.aureus* ATCC 43300. Jedoch liegen alle MIC-Werte sehr nah beieinander, so dass daraus kein Zusammenhang zwischen Strukturunterschieden und Wirksamkeit abgeleitet werden kann.

Die MIC-Konzentrationen an *C.albicans* sind alle größer als $750\ \mu\text{M}$. Auch bei der maximal eingesetzten Substanzkonzentration konnte keine Inhibition des Pilzwachstums festgestellt werden, wodurch die Substanzen als inaktiv angesehen werden können und keine antimykotischen Eigenschaften aufweisen.

6.2 Inhibition der bakteriellen Thioedoxinreduktase

Die grundlegende Methode beruht, wie bei der Testung der - Säugetier-TrxR – Inhibition auch, auf der enzymatischen Umwandlung von DTNB zum gelb gefärbten TNB, dessen Chromophor UV-metrisch detektiert werden kann (siehe Kapitel 4.5).

Auch in dieser Versuchsreihe wurde zunächst ein Vorscreening am Enzym durchgeführt, um die prozentuale Enzyminhibition bei einer Substanzkonzentration von 10 μM zu bestimmen. Die Leitstrukturen für die IC_{50} -Wert Bestimmung wurde in Anlehnung an den Enzymtest der Säugetier-TrxR (siehe Kapitel 4.5.1) ausgewählt: Von den Liganden **2a**, **2b** und **2f**, sowie den korrespondierenden Ruthenium(II)-NHC-Komplexe **3a**, **3b**, **3f** wurden die genauen halb inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) an der *E.coli*-TrxR bestimmt.

Substanz	Substituent	Enzyminhibition	IC_{50} -Werte
		[%]	[μM]
2a	-H	4,0 $^{\pm 13,3}$	>100
2b	-CH ₃	n.a.	>100
2c	-OCH ₃	n.a.	n.b.
2d	-F	n.a.	n.b.
2e	-Cl	n.a.	n.b.
2f	-Br	n.a.	>100
3a	-H	4,8 $^{\pm 11,9}$	24,8 $^{\pm 5,4}$
3b	-CH ₃	22,5 $^{\pm 1,5}$	14,0 $^{\pm 1,6}$
3c	-OCH ₃	24,7 $^{\pm 7,4}$	n.b.
3d	-F	n.a.	n.b.
3e	-Cl	8,1 $^{\pm 9,3}$	n.b.
3f	-Br	22,7 $^{\pm 4,1}$	>100

Tab. 23: Prozentuale Inhibition der *E.coli*-TrxR im Vergleich zur Positivkontrolle [%], eingesetzte Substanzkonzentration: 10 μM , n=2, vs. IC_{50} -Werte in μM , n=3, n.a.: nicht aktiv, n.b.: nicht bestimmt.

Auffallend ist, dass bis auf Ligand **2a** mit einer sehr geringen Enzyminhibition von 4,0 % alle Benzimidazoliumbromide bei 10 μM keine Aktivität am Enzym zeigen. Zudem ist die Standardabweichung von Ligand **2a** sehr hoch, wodurch man den Wert als eine nicht vorhandene Enzyminhibition deuten kann. Im Vergleich dazu sind die Komplexe deutlich aktiver am Enzym. Es

werden Enzyminhibitionen bis zu ca. 25 % mit den Komplexen **3b**, **3c** und **3f** erreicht. Lediglich Komplex **3d** zeigt keine Enzyminhibition bei einer Konzentration von 10 μM .

An den IC_{50} -Werten ist erkennbar, dass alle getesteten Liganden keine signifikante Aktivität am Enzym aufzeigen: Der IC_{50} -Wert liegt $>100 \mu\text{M}$. Das gleiche trifft auf den Komplex **3f** zu. Der unsubstituierte Komplex **3a** weist einen IC_{50} -Wert von ca. 25 μM auf. Eine Aktivitätssteigerung auf 14 μM konnte mit einer Methylgruppe am Benzimidazol, realisiert in Komplex **3b**, erreicht werden.

Vergleicht man diese Werte mit der Bestimmung an der Säugetier-TrxR, werden in dem Versuch an der *E.coli*-TrxR IC_{50} -Werte im höheren mikromolaren Bereich erzielt, die Substanzen sind an der *E.coli*-TrxR deutlich weniger aktiv.

Die bakterielle TrxR zeigt sich durch eine deutlich höhere Substratspezifität als die Säugetier-TrxR aus (siehe Kapitel 1.4.2). Das aktive Zentrum der humanen TrxR ist deutlich zugänglicher für Substrate. [115] Darüber hinaus ist im aktiven Zentrum der Säugetier-TrxR ein Cystein gegen ein Selenocystein ausgetauscht, welches den elektrophilen Charakter im aktiven Zentrum verstärkt und damit dem aktiven Zentrum eine höhere Aktivität verleiht. [112] Zudem kann auch der N-Terminus des Enzyms Reduktionen katalysieren, wodurch die Substratspezifität der Säugetier-TrxR deutlich erniedrigt wird. [112] Dadurch lassen sich auch die höheren IC_{50} -Werte an der *E.coli*-TrxR erklären. Die Substanzen werden am Enzym mit einer niedrigeren katalytischen Aktivität umgesetzt. Aus diesem Grund wurde auch direkt ein größerer Konzentrationsbereich von 100 μM untersucht und nicht wie bei der TrxR-Messung im Kapitel 4.5 ein Bereich von 50 μM .

6.3 Zusammenfassung

Da die antibakteriellen Eigenschaften nur an ausgewählten Substanzen erforscht wurden, können Struktur-Wirkungsbeziehungen nur in geringem Umfang abgeleitet werden. Der Substituent am Ringsystem hat einen Einfluss auf die Interaktion mit der *E.coli*-TrxR. Dabei stellt sich der Komplex mit Methylsubstituent **3b** als am potentesten heraus. Die Substitution mit Brom hat hingegen einen negativen Einfluss auf die Inhibition des Enzyms. Mit einem IC_{50} -Wert $>100 \mu\text{M}$ ist Substanz **3f** nicht mehr am Enzym aktiv. Dies korreliert überraschenderweise nicht mit dem MIC-Wert von ca. 10 μM auf Bakterienebene an den gram-positiven Stämmen. Die MIC-Werte liegen sonst bei allen Komplexen im ähnlichen mikromolaren Bereich von ca. 25 μM . Herauszustellen sind hierbei die niedrigen MIC-Konzentrationen von **3d** und **3f** am MRSA-Stamm *S.aureus* Stamm ATCC 43300. Besonders bemerkenswert stellt der Vergleich von den Benzimidazoliumbromiden (Liganden **2a-2f**) zu den Rutheniumkomplexen (**3a-3f**) dar. Es konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung durch die

Komplexbildung erzielt werden. Alle Liganden sind am Enzym inaktiv ($IC_{50} > 100 \mu M$) und auch die MIC-Werte liegen bei deutlich höheren Konzentrationen als bei den korrespondierenden Komplexen. Einzig der Ligand **2c** bildet eine Ausnahme. Hier konnten auch an gram-positiven Bakterienstämmen MIC-Werte im mikromolaren Bereich von ca. $20 \mu M$ erzielt werden.

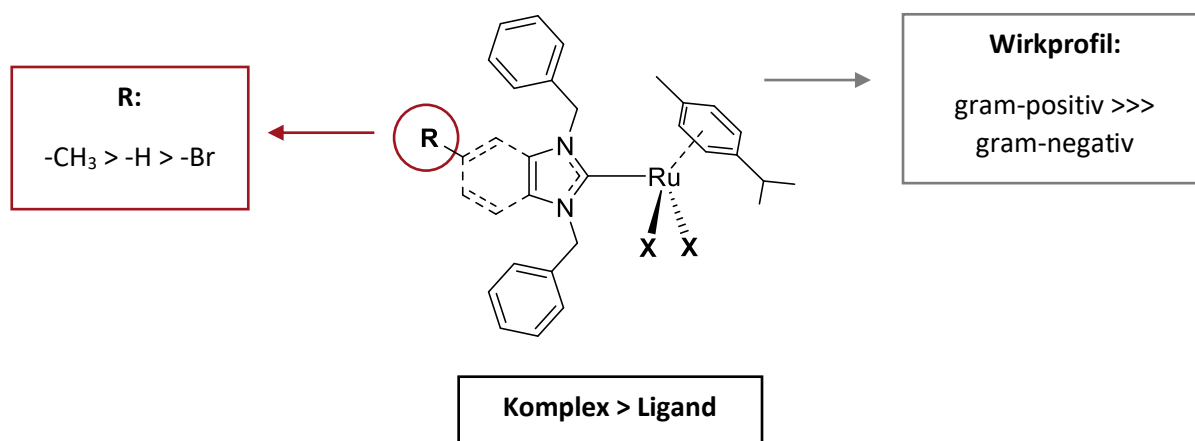


Abb. 81: Mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe auf Grundlage der Testungen der antibakteriellen Aktivität.

Das Wirkprofil ergibt eine überlegene Wirksamkeit an gram-positiven Bakterienstämmen. An den gram-negativen Stämmen, sowie der Pilzart *C.albicans* sind die Substanzen nicht aktiv. Eine Erklärung liefern die Mechanismen zur Erhaltung der Redox-Homöostase in Bakterienzellen.

In gram-negativen Stämmen trägt sowohl das Glutathion-System als auch das Thioredox-System zur Entgiftung von ROS und zur Synthese der Desoxyribonukleotiden zur DNA Synthese bei (siehe Kapitel 1.4.2). In gram-positiven Stämmen ist kein GR-System vorhanden. [115] Kommt es zur Inhibition der TrxR und damit des Trx-Systems, hat die Bakterienzelle keine Möglichkeiten mehr ROS zu entgiften, bzw. Ribonukleotide zu reduzieren. [115] Infolgedessen kann keine DNA mehr synthetisiert werden. Zudem können ROS die Apoptose einleiten. Das Bakterienwachstum bleibt aus. Bei Inhibition der TrxR in gram-negativen Stämmen trägt das GR-System zur Entgiftung bei und das Zellwachstum wird weiterhin sichergestellt.

Darüber hinaus könnte der Aufbau der Zellwand der Bakterien zu den unterschiedlichen Ergebnissen an gram-positiven und -negativen Stämmen führen. Bakterienzellen besitzen eine Cytoplasmamembran, der von außen eine Zellwand aus Murein aufgelagert ist. Dies ist ein Peptidoglykan, welches aus *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure durch die Transpeptidase β -1,4-glykosidisch verknüpft wurde. Die Mureinschicht ist in gram-positiven Erregern sehr viel dicker aufgebaut als im gram-negativen Bakterium. Dafür ist bei gram-negativen Stämmen die einschichtige

Mureinschicht mit einer äußeren Membran umhüllt, die Proteine und Lipopolysaccharide enthält. Diese Schicht lässt sich sehr viel schwerer passieren als die einer gram-positiven Bakterienzelle. Da das Zieltarget TrxR im Cytosol des Bakterium vorliegt, ist eine Zellaufnahme unabdingbar. Bei den gram-negativen Stämmen könnte die Zellaufnahme geringer ausfallen, wodurch sich die überlegene Wirksamkeit der Ruthenium(II)-NHC-Komplexen an den gram-positiven Erregern ergibt.

Bisher sind wenige Studien über die antibakteriellen Eigenschaften von Ruthenium bekannt. Die antimikrobielle Aktivität wurde bereits von Tocher et al. für an Metronidazol koordiniertes Ruthenium(II) beschrieben, welches die Aktivität im Vergleich zu Metronidazol alleine an *E.coli* Stämmen erhöhen konnte. [47] Carbenkomplexe waren den Stickstoff-Donor-Komplexen überlegen. [222] Es zeigte sich keine Aktivität an gram-negativen Stämmen wie *P.aeruginosa*. [222] Es konnten bereits Rückschluss gezogen werden, dass hydrophobere Substituenten einen positiven Einfluss auf die Zellaufnahme und damit die Aktivität haben. [47]

Auch die antibakterielle Aktivität von Ruthenium(II) komplexiert an Thiosemicarbazone konnte bereits nachgewiesen werden. [223] Die antibiotisch wirksamen Chinolone, welche gebunden an Ruthenium(II) dargestellt wurden, wurden nur auf Antitumor-Eigenschaften untersucht. [87] Der Einsatz von Rutheniumkomplexen an Trypanosomen und Leishmanien wurde ebenfalls bereits diskutiert. [224] Dennoch ist die Wirkungsweise von Rutheniumkomplexen an Bakterienzellen noch weitestgehend unerforscht, vor allem die Interaktion mit der bakteriellen TrxR.

Die Forschung der antibakteriellen Wirkungsweise erstreckt sich bisher auf Silber- oder Gold-NHC-Komplexe. [70,225] Auranofin wurde besonders ausführlich auf das antibakterielle Verhalten untersucht. Auch zahlreiche Gold-NHC-Komplexe wurden getestet. So lieferten Gold(I)-NHC-Komplexe und Gold(I)-Biscarben-Komplexe ebenfalls eine deutliche überlegene Wirksamkeit an gram-positiven Stämmen, mit MIC Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich. [129,138] Dabei waren die Mono-NHC-Komplexe den Biscarben-Komplexen in der Aktivität überlegen. [129] Auranofin lieferte dabei noch deutlich niedrigere MIC-Werte. [138,226] Vor allem an den gram-negativen Stämmen wurden deutlich höhere Aktivitäten von Auranofin erzielt im Vergleich zu Rutheniumkomplexen. [226] Die Testung an der bakteriellen TrxR lieferte allerdings IC₅₀-Werte von 30-400 µM. [138] Hier waren die vergleichbaren Mono-NHC-Komplexe an der TrxR mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich deutlich aktiver. [227]

Auch hier könnte die überlegende Wirksamkeit der Gold(I)komplexe mit der Säurestärke nach HSAB-Konzept erklärt werden, wodurch die größere Interaktion mit der Thioredoxinreduktase erklärbar würde (siehe Kapitel 4.5.5).

Zwar sind die hier getesteten Rutheniumkomplexe den gängigen Antibiotika und getesteten Gold(I)komplexen nicht überlegen, dennoch ist die Aktivität v.a. an gram-positiven Stämmen vielversprechend genug, um die Entwicklung weiterer Rutheniumkomplexe voran zu treiben.

7. Zusammenfassende Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Ruthenium(II)-NHC-Komplexe synthetisiert und biologisch analysiert. Die Leitstruktur **3a** konnte an vier verschiedenen Positionen unter Erhalt der lipophilen Seitenketten erfolgreich modifiziert und neue Substanzserien synthetisiert werden. Einige verwendete Synthesemethoden konnten dabei unter Erreichen höherer Ausbeuten optimiert werden. Die erfolgreiche Umsetzung zu den gewünschten Produkten wurde mittels NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse, Massenspektroskopie und z.T. auch über Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen. Unter Zuhilfenahme von 2D-NMR-Spektroskopie wurden die Signale der Protonen und Kohlenstoffe der Moleküle so genau wie möglich zugeordnet und dabei spektroskopische Besonderheiten dieser Substanzklasse aufgezeigt. Nach der erfolgreichen Darstellung der Produkte wurden sowohl die Alkyl-(benz-)imidazoliumhalogenide (bezeichnet als Liganden **2**), als auch die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe **3** im Hinblick auf den Einsatz als potenzielle Chemotherapeutika in verschiedenen bioanalytischen Testverfahren evaluiert.

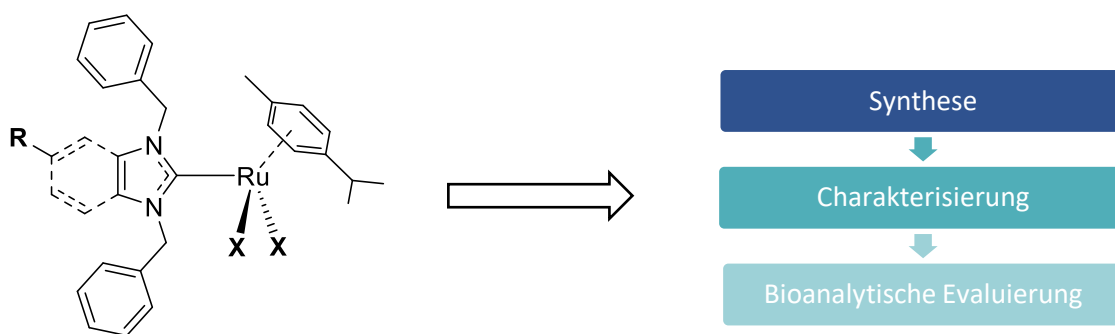


Abb. 82: Schematische Darstellung des inhaltlichen Aufbaus dieser Arbeit.

Im Hinblick auf den Einsatz als Zytostatikum lieferten die Antiproliferationsmessungen an drei verschiedenen malignen Zelllinien vielversprechende Ergebnisse. Die (Benz-)Imidazole und Rutheniumdimere erwiesen sich mit IC_{50} -Werten $> 100 \mu M$ als inaktiv. Eine deutliche Aktivitätssteigerung konnte durch Substitution der Stickstoffe mit Benzylseitenketten und Erhalt der (Benz-)Imidazoliumhalogenide erreicht werden (siehe Abb. 83). Dabei wurden IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich von $10 \mu M$ - $100 \mu M$ erhalten. Durch Komplexierung der NHC-Liganden an das Ruthenium-dihalogenido-*p*-cymol-Fragment konnte die Aktivität vor allem bei den in der 5-Position des Benzimidazols halogenierten Komplexen **3d-3f** deutlich gesteigert werden, wobei IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich erzielt wurden. Bei Komplex **3f** konnte die Aktivität im Vergleich zu dem entsprechenden Liganden **2f** sogar um das 15-fache gesteigert werden.

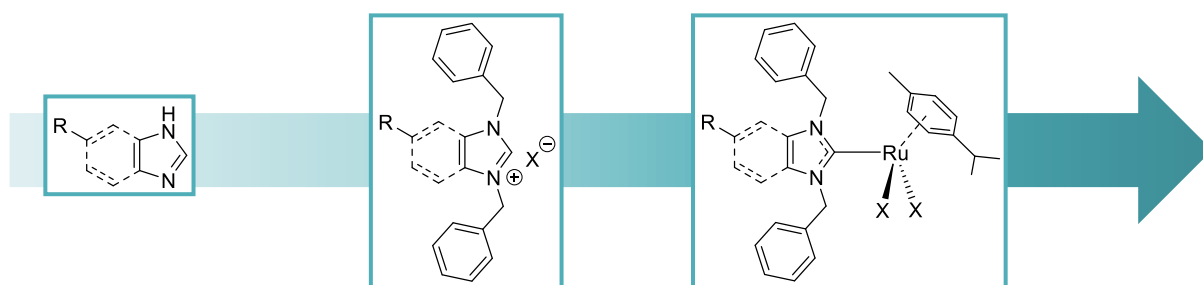


Abb. 83: Aktivitätssteigerung im Antiproliferationsstest von der Ausgangsstruktur (Benz-)Imidazol, über die (Benz-)Imidazoliumhalogenide zu den Ruthenium(II)-NHC-Komplexen.

Betrachtet man die Substitution des Benzimidazol-Komplexes, stellten sich die methylierte, chlorierte und bromierte Variante **3b**, **3e** und **3f** am aktivsten heraus (siehe Abb. 84). Die Bromierung am Imidazol, realisiert im Liganden **2h** und Komplex **3h** brachte auch dort eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 4 im Vergleich zu den nichtsubstituierten Substanzen **2g** und **3g** hervor. Ausgehend vom Imidazolgrundkörper ist diese Substanzgruppe bezogen auf das antiproliferative Verhalten an den untersuchten Zelllinien mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich von 25 μ M - 100 μ M den Benzimidazolstrukturen deutlich unterlegen. Die weitere Substitution mit Methoxy-, oder Fluorsubstituenten in der 5-Position des Benzimidazols brachte keine Aktivitätssteigerung der Proliferationshemmung hervor.

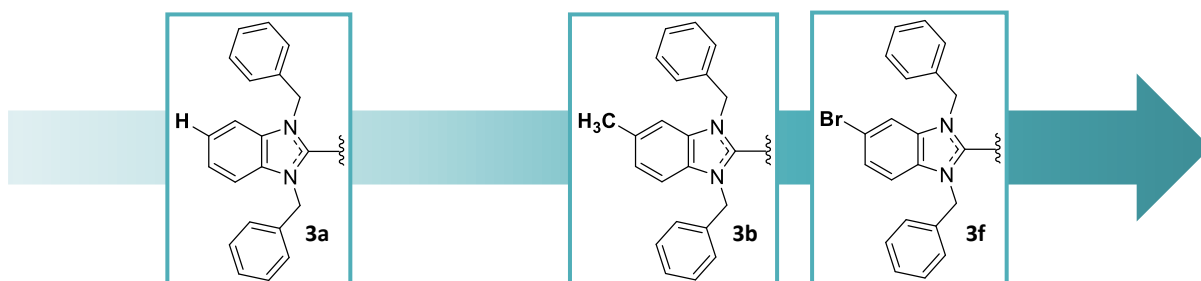


Abb. 84: Aktivitätssteigerung in Antiproliferationsstest und Zellaufnahmestudien vom unsubstituierten Komplex **3a**, über den methylierten Komplex **3b** zum bromierten Komplex **3f**, wobei **3b** und **3f** ähnliche Aktivität aufweisen, **3f** aber eine höhere Zellaufnahme ohne Zusatz von FCS zum Medium besitzt.

Der Erhalt der lipophilen Seitenketten ist für das antiproliferative Verhalten an den Krebszelllinien essenziell. Bereits bei gemischt methylierten/benzylierten Komplexen **3a_{Cl}-MeBn** und **3a_{Br}-MeBn** wurde ein deutlicher Aktivitätsabfall mit IC_{50} -Werten von 30 μ M - 80 μ M festgestellt. Zweifach methylierte Komplexe waren an den Zelllinien nicht mehr aktiv ($IC_{50} > 100 \mu$ M).

Bei den Liganden am Ruthenium(II)atom waren die Bromido-Liganden den anderen getesteten Halogenido-Liganden schwach überlegen, allerdings nur bei den gemischt methylierten/benzylierten Komplexen **3a_{Cl}-MeBn** und **3a_{Br}-MeBn**. An den zweifach benzylierten Komplexen ließ sich kein Aktivitätsunterschied mehr erkennen.

Die Substanz **3i** stellt mit Mesitylenseitenketten an den Stickstoffen des Imidazols eine strukturelle Besonderheit zu den ansonsten getesteten Metallkomplexen dar. Sie lieferte vielversprechende Ergebnisse im Zellviabilitätstest, konnte aber nur in geringen Mengen in ausreichender Reinheit erhalten werden. Zusätzlicher Optimierungsbedarf der Synthese und weitere bioanalytische Testung sind deshalb von großem Interesse.

Der Vergleich der Aktivität zwischen den Zelllinien lieferte keinen Unterschied. Die Liganden und Komplexe waren in der Regel an der MCF-7 Brustkrebszelllinie geringfügig aktiver. Leider konnten alle Substanzen keine Selektivität an malignen Zellen aufweisen. So wurde ein ähnliches Aktivitätsprofil auch an der humanen Nierenzelllinie RC-124 erreicht, außer bei Komplex **3a**, der ein zweifach geringeres antiproliferatives Verhalten an dieser Zelllinie zeigte.

Durch Videomikroskopaufnahmen konnte das antiproliferative Verhalten über morphologische Änderungen bestätigt werden, da ein Absterben der MCF-7 Zellen unter Substanzzugabe von **3a** und **3b** sichtbar wurde. Durch Konfluenzmessungen zeigte sich, dass erst nach einer gewissen Inkubationszeit die Abnahme der Zellzahl eintritt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Zellaufnahmestudien, bei denen der Rutheniumgehalt in MCF-7 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mithilfe der AAS bestimmt werden konnte.

Hierbei zeigte sich bei jeder Messung eine Akkumulation des Rutheniums über den Messzeitraum. Bei allen Messungen wurde nach 24 h Inkubationszeit der größte Gehalt an Ruthenium detektiert.

Die Zellaufnahme wurde durch den Methylsubstituenten am Benzimidazol (Komplex **3b**) und den halogenierten Komplexen **3d-3f** im Vergleich zum unsubstituierten Komplex **3a** nach 24 h nahezu verdoppelt. Der bromierte Komplex **3f** zeigte vor allem unter Ausschluss von FCS zum Medium eine deutliche Anreicherung in MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubationszeit. Hingegen erzielte die Substitution mit einer Methoxygruppe eine geringere Zellaufnahme. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Aktivitätsprofil der Substanzen im Zellviabilitätstest (siehe Abb. 84).

Der Benzimidazolgrundkörper ist auch in den Zellaufnahmestudien dem Imidazolgrundkörper überlegen, wodurch die geringere Aktivität der Imidazolstrukturen im Zytotoxizitätstest erklärt werden kann. Der Bromido-Komplex **3b_{Br}** wurde im Vergleich zu den Chlorido- oder Iodido-Komplexen verstärkt in die Zelle aufgenommen. Der Austausch zeigte aber keinen Einfluss auf das antiproliferative Verhalten. Der Austausch gegen Pyrithion erhöhte die Zellaufnahme drastisch, was mit den Ergebnissen im Zytotoxizitätstest übereinstimmt. Der nicht an einen NHC-Liganden gebundene Komplex **Pth-Ru** wies zwar auch deutlich zytotoxische Eigenschaften auf, jedoch konnte auch nach 24 h Inkubationszeit kein Ruthenium in den Zellen detektiert werden konnte. Die Metall-NHC-Bindung scheint daher bei dieser Substanzgruppe für die Zellaufnahme essenziell zu sein.

Die Quantifizierung des organisch gebundenen Fluors gelang sowohl bei dem Ligand **2d** wie bei dem Komplex **3d** über die Bildung von Galliummonofluorid mittels MolekülabSORptionsspektroskopie. Dabei zeigte sich, dass **2d** in die Zellen aufgenommen wird, allerdings erst nach 24 h in quantifizierbaren Mengen. Dies erklärt die Aktivität im Zellviabilitätstest. Komplex **3d** konnte über den Inkubationszeitraum nicht detektiert werden. Aufgrund der geringeren Sensitivität der Fluorbestimmung lag hier die Nachweisgrenze oberhalb der zu erwartenden Konzentration, die sich aus der nach 24 h gemessenen Ruthenium-Akkumulation im vermessenen Zellpellet ableiten ließ. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass der Komplex intakt in die Zelle gelangt, ohne dass eine Spaltung der Carben-Metallbindung eintritt. Es kann andererseits jedoch ausgeschlossen werden, dass nur der Ligand sich innerhalb des Messzeitraums in großen Mengen in der Zelle anreichert. Das Ergebnis spricht also nicht gegen die These, dass der Komplex intakt bleibt und Ligand und Metallfragment im Verhältnis von 1:1 die Zelle erreichen. Weitere Stabilitätsuntersuchungen sind jedoch notwendig, um diesen Aspekt genauer zu evaluieren.

Das antiproliferative Verhalten der Liganden und Komplexe kann über verschiedene Mechanismen begründet werden. Zum einen konnte das Verhalten auf die Einleitung von Apoptose-Vorgängen zurückgeführt werden. In verschiedenen Versuchen konnten für die Liganden **2a** und **2b**, sowie der Komplexe **3a** und **3b** die Induktion der Apoptose in Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde die Apoptose durch die Rutheniumkomplexe stärker induziert im Vergleich zu den korrespondierenden Liganden. Es spricht vieles für den mitochondrialen Signalweg als Auslöser der Apoptose. Nekrotisches Verhalten auf die Zellen konnte ausgeschlossen werden. Die Substanzen scheinen darüber hinaus Substrat des P-Glykoproteins zu sein, da die Resistenzen in den Zelllinien, welche dieses Protein überexprimieren, nicht durchbrochen werden konnten. Auch wenn in den Zellviabilitätstestungen keine Selektivität gegenüber gesunden Zellen beobachtet werden konnte, wurde diese bei Apoptoseuntersuchungen an humanen Leukozyten nachgewiesen, da unter Substanzzugabe keine Apoptose induziert werden konnte. Die Videomikroskopaufnahmen im Rahmen des Live-Cell Imaging von **3a** und **3b** bestärken die Apoptosestudien, da die typischen morphologischen Änderungen, wie die starke Schrumpfung und Ausbilden einer Kugelform, einer apoptotischen Zelle beobachtet werden konnten.

Darüber hinaus kommt die Interaktion mit der Thioredoxinreduktase als weiterer Wirkmechanismus in Frage. Eine Inhibition konnte hier sowohl mit den Liganden, als auch mit den Komplexen erreicht werden, jedoch zeigt das Aktivitätsprofil eine deutliche Überlegenheit der Komplexe im Vergleich zu den Liganden, die mit IC_{50} -Werten $> 50 \mu M$ keine nennenswerte Aktivität an der Säugetier-TrxR besitzen.

Am Enzym sind andere Substituenten-Einflüsse als im Zytotoxizitätstest erkennbar (siehe Abb. 85): Während dort der unsubstituierte Komplex **3a** eine geringere Aktivität aufwies, zeigte **3a** hier deutlich niedrigere IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich als der methylierte, bzw. der bromierte Komplex **3b** und **3f**. Die gleiche Tendenz konnte auch an den Ruthenium(II)-NHC-Komplexen mit Imidazolgrundkörper beobachtet werden, wobei parallel zu den Zytotoxizitätsuntersuchungen auch hier die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe mit Benzimidazolgrundkörper den Komplexen mit entsprechendem Imidazolgrundkörper überlegen waren.

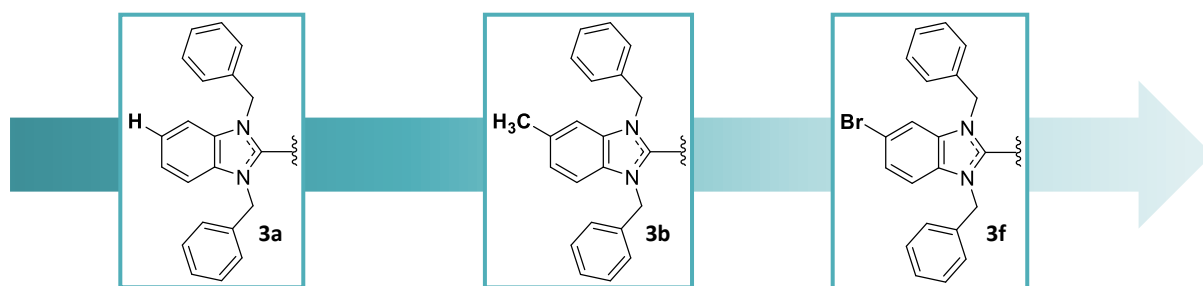


Abb. 85: Aktivitätsabnahme im Inhibitionstest der Säugetier-TrxR (ausgehend von den IC_{50} -Werten) vom unsubstituierten Komplex **3a**, über den methylierten Komplex **3b** zum bromierten Komplex **3f**.

Die Halogensubstitution am Rutheniumatom hat gemessen am IC_{50} -Wert keine Auswirkung auf die Wirksamkeit am Enzym, auch wenn bei Messung der prozentualen Inhibition einer fixen Konzentration von 10 μ M deutliche Wirkunterschiede mit vorrangiger Aktivität der Iodido-Komplexe zu Tage treten. Der Austausch gegen Pyrithion zeigte keinen Einfluss auf den gemessenen IC_{50} -Wert.

Obwohl unzweifelhaft eine Interaktion der Ruthenium(II)-Komplexe mit der TrxR stattfindet, stellt diese offenbar kein zentrales Target dar, wie es für die Gold(I)komplexe diskutiert wird, da mit diesen Strukturen deutlich stärkere Inhibitionen mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich erreicht werden. [197]

Wahrscheinlicher ist die Interaktion mit Proteinen, die als Wirkmechanismus für Ruthenium(II)-Komplexe in der Literatur postuliert wird. Eine Variante stellt die Interaktion mit Transferrin dar. Dafür wurde sowohl die Zellviabilität als auch die Zellaufnahme von **3b** unter Zusatz von ATF erforscht. Bei der Zellaufnahme unter Zugabe von ATF zeigte sich in der Tat eine 1,5-fach höhere Zellaufnahme als ohne Zugabe. Dabei spielte die Größe der ATF-Konzentration (1, bzw. 5-fache Menge) keine Rolle.

Die Bindung von Ruthenium-Komplexen an ATF konnte bereits am Beispiel von KP1019 gezeigt werden, jedoch wird hier als Hauptwirkmechanismus die Interaktion mit Albumin vermutet. [30,50]

Die Bindung an Albumin (gemessen an BSA) wurde auch an den Ruthenium(II)-NHC-Komplexen **3a-3f** untersucht. Jedoch konnten hier nur eine sehr moderate Bindungsrate von ca. 20 % nach 4 h erreicht werden. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Zellaufnahmestudien, wurde die Zellaufnahme mit FCS (welches neben ATF vor allem Albumin enthält), nicht erhöht, durch ATF-Zugabe jedoch schon. Dagegen führte die Abwesenheit von FCS vom Medium während der Zellaufnahmestudien zu einer erhöhten Akkumulation von Ruthenium in den Zellen, welche vor allem bei den halogenierten Komplexen **3d – 3f** auftrat.

Dies spiegelt sich auch in der Zytotoxizität wider. Unter ATF-Zugabe und unter Ausschluss von FCS zum Medium konnte ein deutlich niedriger IC₅₀-Wert von **3b** an MCF-7 Zellen erreicht werden. Proteine scheinen also einen Einfluss auf die Zellaufnahme zu besitzen. Wodurch die erhöhte Zellaufnahme und Zytotoxizität genau erreicht wird, lässt sich an dieser Stelle noch nicht sagen. Eventuell wird die Zellaufnahme unter ATF begünstigt und unter Albumin verringert. Dafür sind weitere Studien mit Transferrin und Albumin, am besten unter Zuhilfenahme von Protein-Kristallstrukturen notwendig, um den Bindungsmechanismus intensiver zu erforschen. Ob die Ruthenium(II)-NHC-Komplexe über den Eisen-Stoffwechsel mittels Bindung an ATF bevorzugt in die Krebszelllinien gelangen, kann an dieser Stelle nicht bewertet werden.

Die Substituenteneinflüsse lassen sich nur schwer in Einklang bringen. Dies ist angesichts der Tatsache, dass ganz unterschiedliche Wirkmechanismen eine Rolle spielen können, jedoch nicht verwunderlich. Zum einen zeigten der methylierte Komplex **3b** und der bromierte Komplex **3f** erhöhte antiproliferative Eigenschaften, vermutlich aufgrund der erhöhten Zellaufnahme, zum anderen jedoch geringere Aktivität an der TrxR (im Vergleich zu **3a**). Die Substituenten besitzen mit jeweils einem +I-Effekt und einem -I-Effekt unterschiedliche elektronische Eigenschaften. Der Brom-Substituent hat einen größeren Van-der-Waals-Radius als die anderen Halogen-Substituenten und damit einhergehend eine größere Lipophilie. Dies könnte zu einer höheren Zellaufnahme führen. Häufig korreliert das zytotoxische Verhalten mit der Lipophilie der Komplexe. [50]

Ob die Methylgruppe einen entscheidenden Einfluss auf die Lipophilie hat, lässt sich ohne Bestimmung des log P-Wertes nicht sicher beurteilen. Dass die Lipophilie bei der Zellaufnahme eine Rolle spielt, konnte bereits von Oehniger et al. festgestellt werden. [126] Die Ergebnisse der Aktivität der gemischt substituierten Komplexe **3a_{Cl}-MeBn** und **3a_{Br}-MeBn** konnten die Ergebnisse noch erhärten.

Bei den bisherigen Untersuchungen blieb die Frage gänzlich unberücksichtigt, welche elektronischen und sterischen Anforderungen an den Komplex gestellt werden müssen, damit es zu einer optimalen Interaktion in der Bindetasche des möglichen Targets TrxR kommen kann. Hier sollten sowohl die Substituenten am Ring wie die am Stickstoff einen wichtigen Einflussfaktor darstellen, der die Aktivität

der Verbindungen mitbestimmt. Über Röntgenstrukturanalysen von Kokristallisaten oder auf theoretischem Weg mit Molecular Modelling-Methoden könnten hier weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

Betrachtet man die ligand- und metallbasierten Effekte, wird deutlich, dass zwar bereits die (Benz-)Imidazoliumhalogenide als Vorstufen für die NHC-Liganden schwach zytotoxisch sind, jedoch erst die Komplexierung an das Ruthenium-dihalogenido-*p*-cymol-Fragment zu einer entscheidenden Aktivitätssteigerung führt. Erst über den Metallkomplex konnte bei einigen Strukturen eine vielversprechende antiproliferative Aktivität erzielt und vor allem stärkere Interaktionen mit der Säugetier TrxR und bakteriellen TrxR erreicht werden. Zudem sind die Liganden notwendig, um entsprechende Zielstrukturen zu erreichen, da sie dem Molekül die nötige Lipophilie verleihen.

Auch bei den Messungen auf das antibiotische Verhalten sind die Rutheniumkomplexe den Liganden deutlich überlegen. Dabei zeigt sich eine erhöhte Wirksamkeit des methylierten Komplexes **3b**, bei Substitution mit Brom in der 5-Position des Benzimidazols (**3f**) wird die Wirksamkeit aufgehoben. Die Ergebnisse an der isolierten *E.coli*-TrxR fallen im Vergleich zu Gold(I)-Komplexen zwar deutlich schlechter aus, jedoch werden bei MIC-Testungen an den Bakterienstämmen vielversprechende Ergebnisse erzielt. So wurden vor allem in gram-positiven Bakterienstämmen, wie dem MRSA-Stamm *S.aureus* ATCC 43300 MIC-Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich, ähnlich wie bei gängig eingesetzten Antibiotika, erzielt. Der Einsatz von Ruthenium(II)-Komplexen als Antibiotika ist bisher nur wenig erforscht. Vor allem die Interaktion an der bakteriellen TrxR mit Ruthenium(II)-Komplexen wurde bisher nicht publiziert. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt zur Entwicklung weiterer Strukturen, die eine gezielte Inhibition der *E.coli*-TrxR ermöglichen. Vermutlich stellt die TrxR allerdings nicht das Haupttarget dar, da die Inhibitionen mit Goldkomplexen noch deutlich stärker ausfallen. [138,226]

Abschließend können an dieser Stelle folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen postuliert werden (siehe Abb. 86):

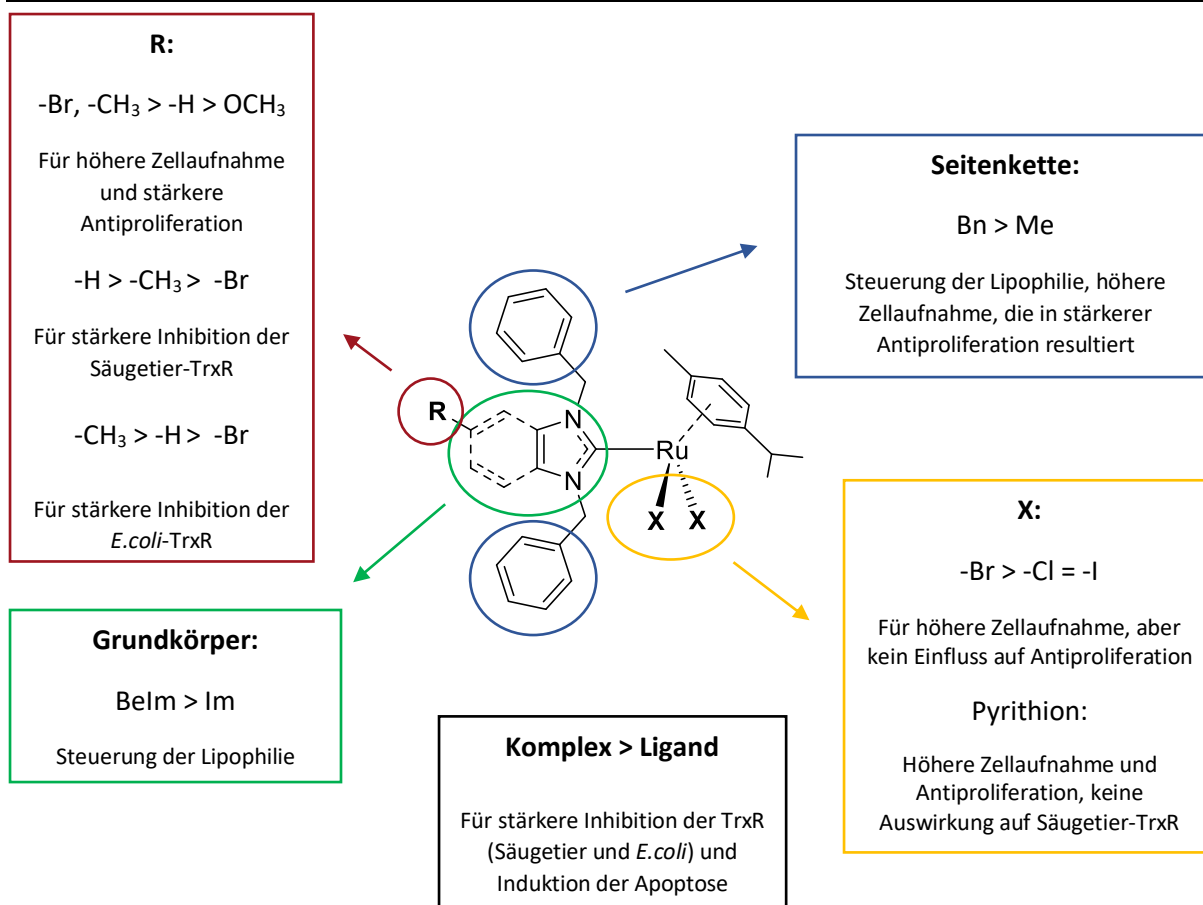


Abb. 86: Schematisch dargestellte Struktur-Wirkungsbeziehungen der neu synthetisierten Ruthenium(II)-NHC Komplexe basierend auf den durchgeführten Testmethoden.

Für eine höhere Zellaufnahme und damit einhergehend stärkeres antiproliferatives Verhalten sind ein größerer lipophiler Grundkörper, realisiert im Benzimidazol, und große lipophile Seitenketten wie Benzylgruppen an beiden Stickstoffen essenziell. Durch Substitution mit einer Methyl- oder Brom-Funktion an der 5-Position (**3b** und **3f**), kann die Zellaufnahme erhöht werden. Die Interaktion mit der Säugetier- und *E.coli*-TrxR findet bevorzugt mit unsubstituierten Komplexen (**3a** und **3g**) statt. Der Austausch der Halogenide am Ruthenium führt zwar zu einer erhöhten Zellaufnahme bei dem Bromido-Komplex (**3b_{Br}**), resultiert aber in keiner höheren Aktivität an den Krebszellen oder an der Säugetier-TrxR. Der Austausch der Chlorido-Liganden gegen Pyrithion liefert eine stärkere Zellaufnahme und damit einhergehend höhere Zytotoxizität. Zwar erreichen die Vorstufen der Pyrithionkomplexe ähnliche IC₅₀-Werte im Zellviabilitätstest wie die NHC-Komplexe, jedoch kann der Pyrithionkomplex **Pth-Ru** nur organometallisch an ein NHC gebunden als NHC-Pyrithion-Ru-Komplex **3aPth-Be** in die Zelle aufgenommen werden. Einen Aktivitätsvorteil an der Säugetier-TrxR (im Vergleich zum Komplex mit Chlorido-Liganden **3a**) liefert dieser Austausch allerdings nicht.

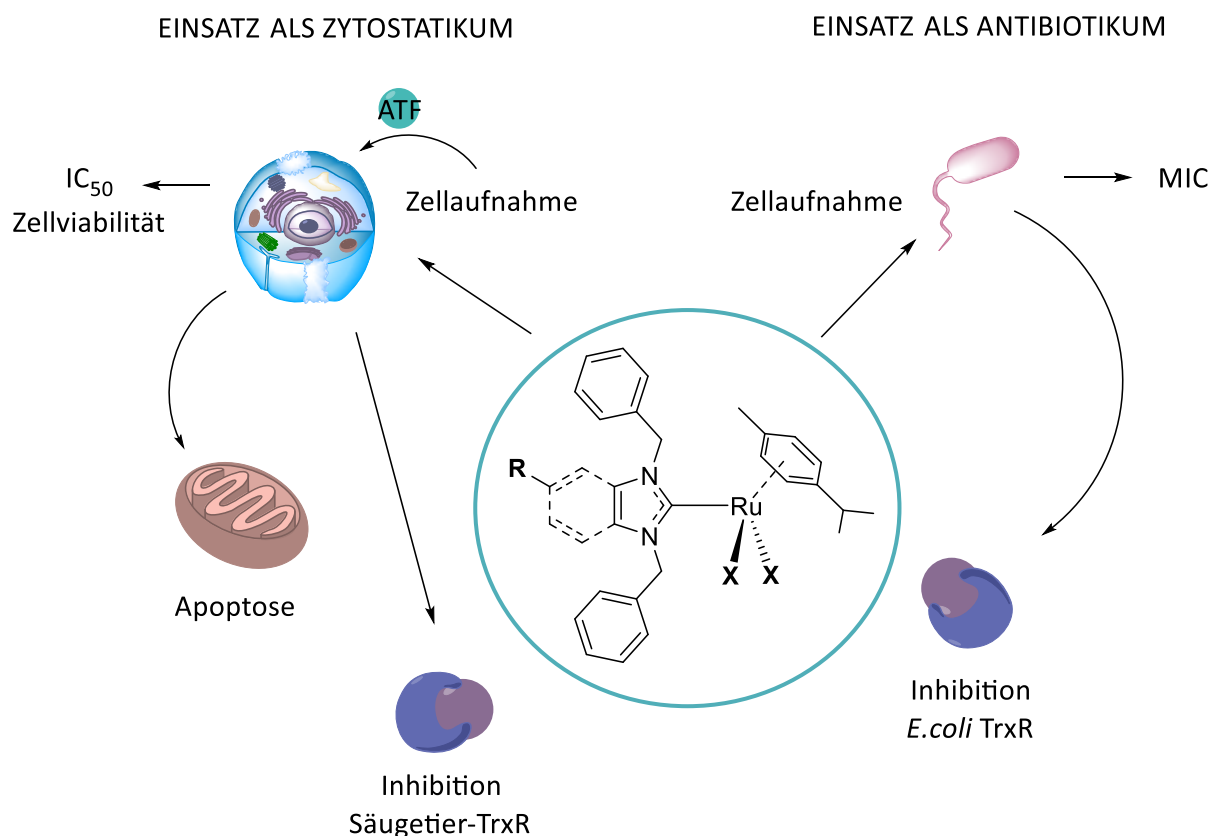


Abb. 87: Die für Ruthenium(II)-NHC-Komplexe getesteten, potentiellen Targets als Einsatz als Zytostatikum und Antibiotikum.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NHC-Ruthenium(II)-Komplexe aussichtsreiche Strukturen sowohl für die Anwendung als Zytostatikum wie als Antibiotikum darstellen, wie die Testung an potenziellen Targets ergeben hat (siehe Abb. 87). Der NHC-Ligand bietet dabei ein Werkzeug, mit dem die für die zytostatische bzw. antibiotische Wirkung essenziellen Eigenschaften eines Ruthenium(II)-Komplexes steuerbar werden. Zu den wichtigen Stellschrauben gehören hierbei besonders die Lipophilie, die die Zellaufnahme als Voraussetzung für eine Wirkung maßgeblich beeinflusst, und die elektronischen Eigenschaften, die im Zusammenspiel mit den sterischen Anforderungen des Komplexes die Interaktion in der Bindetasche des Targets TrxR determinieren. Auch die Sicherstellung einer ausreichenden Löslichkeit kann über den NHC-Liganden beeinflusst werden. Die Entwicklung neuer Strukturen, die diesen Anforderungen Rechnung tragen und ihnen gerecht werden, wird eine herausfordernde aber sicher lohnende Aufgabe sein.

8. Material und Methoden

8.1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Atomabsorptionsspektrometer	HR-CS AAS contraAA 700	Analytik Jena
Autoklav	LTA 2x3x4	Zirbus Technologies
Brutschränke	C 150 CB 160 HeraCell 240i	Binder Binder Thermo Scientific
Elementaranalyse	FLASH EA 1112	Thermo Quest
Inkubator	VORTEMP 56	Labnet
Laminar Air Flow Box	Herasafe KS 12 Herasafe KS 15	Thermo Scientific Thermo Scientific
Life Zellanalysator	Juli™Br	NanoEnTek
Massenspektrometer	MAT95 XL	Finnigan
Mikroskop	EVOSxl	AMG
Kernresonanzspektrometer	AV III 400 (400 MHz) AV III HD 500 (500 MHz) Advance II 600 (600 MHz)	Bruker BioSpin GmbH
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Reader	Victor™ X4	Perkin Elmer
Reinstwasseranlage	Arium©	Sartorius
Rotationsverdampfer	Hei-VAP-Advantage	Heidolph
Schüttler klein	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Schüttler Zellplatten	Titramax 1000	Heidolph
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 Ultrasonic Cleaner	BANDELIN VWR
Waagen	CPA225D Explorer	Sartorius Ohaus
Wasserbad	VWB12	VWR
Zentrifuge klein	Compact Star CS4 CT15RE himac	VWR VWR

Tab. 24: Geräteliste.

8.2 Verwendete Reagenzien

Alle Reagenzien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen *Alfa Aesar*, *Carl Roth*, *Merck* oder *Sigma Aldrich* käuflich erworben. Das NMR-Lösemittel CDCl_3 - d^1 99,8 % wurde von Deutreo bezogen und ist auf 0,03 % TMS standardisiert. Alle Reagenzien, die für biologische Testungen verwendet wurden, besitzen den entsprechenden Reinheitsgrad für die Zellkultur. Für die chemischen Synthesen und ihre Aufarbeitung wurde ionenausgetauschtes Wasser verwendet. Für alle Versuche der Bioanalytik wurde Reinstwasser genutzt.

Apotransferrinlösung, 5 mM (für Zellaufnahmestudien oder Zellviabilitätstests)

130,1 mg bovines Apotransferrin werden in 327,0 μL serumfreien DMEM-Medium unter aseptischen Bedingungen gelöst.

Bradford-Konzentrat

250 mg Serva Blue G, 250 mL Ethanol (96 %), 500 mL H_3PO_4 86 % und 250 mL dest. Wasser werden gemischt und anschließend bei -4°C gelagert.

Bradford-Reagenz

Das Bradford-Konzentrat wird aufgetaut und in einer 1:4-Verdünnung mit Reinstwasser gemischt.

BSA-Lösung, 0,2 % (für TrxR Inhibition)

2,0 mg BSA werden in 1,0 mL Reinstwasser gelöst.

BSA-Lösung, 1 mg / mL (für Bradford-Bestimmung)

1,0 mg BSA werden in 1,0 mL Reinstwasser gelöst.

BSA-Lösung, 40 mg / mL (für Proteinbindungsstudien)

400 mg BSA werden in 10 mL serumfreiem DMEM-Medium gelöst.

DMEM-Medium

500 mL Medium werden mit 25 mg Gentamycin und 50 mL FCS unter aseptischen Bedingungen versetzt.

DMEM-Medium, ohne Supplemente (serumfrei)

500 mL Medium werden mit 25 mg Gentamycin unter aseptischen Bedingungen gemischt.

DTNB-Lösung, 20 mM (für TrxR Inhibition)

23,78 mg DTNB werden in 3,00 mL Ethanol (96 %) unmittelbar vor der Verwendung gelöst.

DTNB-Lösung, 10 mM (für *E.coli*-TrxR Bestimmung)

39,64 mg DTNB werden in 10,00 mL TE-Puffer gelöst.

EDTA Lösung, pH 7,5, 2 mM

292,24 mg EDTA werden in 500 mL dest. Wasser gelöst.

EDTA Lösung, pH 7,5, 100 mM

14,61 g EDTA werden in 500 mL dest. Wasser gelöst und mit 1M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7.5 eingestellt.

Eisen(III)-chlorid-Lösung, 5 mM

1,00 mg Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat werden in 739,9 µL serumfreien DMEM-Medium unter aseptischen Bedingungen gelöst.

Ethanol, 70 %

70 ml Ethanol (96 %) werden mit 30 mL dest. Wasser verdünnt.

Gallium(III)-nitrat, 15 g / L

0,75 g Galliumnitrat werden in 50,0 mL Reinstwasser gelöst.

Gelatinelösung, sterile

1,5 % (m/V) Gelatine wird in Reinstwasser bei 37°C auf dem Wasserbad verflüssigt. Anschließend wird die Lösung autoklaviert.

Glutaraldehydlösung

20 ml Glutaraldehydlösung (25 %) werden mit 500 mL unsteriler PBS-Lösung gemischt.

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 100 mM

21,23 g Kaliumphosphat werden in 1 L Reinstwasser gelöst und mit 5 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Kristallviolettlösung, 0,02%

0,20 g Kristallviolett werden in 1 L Reinstwasser gelöst.

McCoy-Medium

500 mL Medium werden mit 25 mg Gentamycin und 50 mL FCS unter aseptischen Bedingungen versetzt.

NADPH-Lösung, 400 µM

2,0 mg NADPH werden in 5999,9 µL TE-Puffer gelöst.

NADPH-Lösung, 20 mM (für TrxR Inhibition)

16,667 mg NADPH werden in 1,0 ml Reinstwasser gelöst.

NADPH-Lösung, 200 µM (für *E.coli*-TrxR Inhibition)

Die NADPH-Lösung (400 µM) wird mit TE-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt.

PBS-Lösung, pH 7,4

Für 1 L PBS-Lösung werden 8,00 g NaCl, 1,00 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,20 g KCl, 0,20 g KH₂PO₄ und 0,15 g NaH₂PO₄·H₂O in 1L dest. Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit 5 M HCl oder 5 M NaOH Lösung auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Reaktionsmix (für TrxR Inhibition)

Für 1 ml Reaktionsmix werden 500 µL Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0, 100 mM), 80 µL EDTA Lösung, 20 µL BSA-Lösung (0,2 %), 100 µL NADPH-Lösung (20 mM) und 300 µL dest. Wasser gemischt. Die Lösung wird bei 37°C bis zur Verwendung inkubiert.

Reaktionsmix (für *E.coli*-TrxR Inhibition)

NADPH-Lösung (400 µM) und DTNB-Lösung (10 mM) werden im Verhältnis 1:1 gemischt, sodass sich Endkonzentrationen von 200 µM NADPH-Lösungen und 5 mM DTNB-Lösung ergeben.

Salpetersäure, 13% (für AAS Messungen)

20 mL Salpetersäure (65 %) werden zu 80 mL Reinstwasser gegeben.

TE-Puffer

500 mL 100 mM Tris-HCl werden mit 500 mL 2mM EDTA-Lösung (pH 7,5) vermischt, wodurch sich Endkonzentrationen von 50 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA-Lösung ergeben. Die Lösung wird mit 5 M HCl oder 5 M NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt.

Tris-HCl, 100 mM

7,88 g Tris-HCl werden in 500 mL destillierten Wasser gelöst.

Triton® X-100, 0,5 mL / 50 mL (für AAS Messungen)

1 mL Triton® X-100 werden in 100 mL Reinstwasser gelöst.

Trypsin, 0,05 %

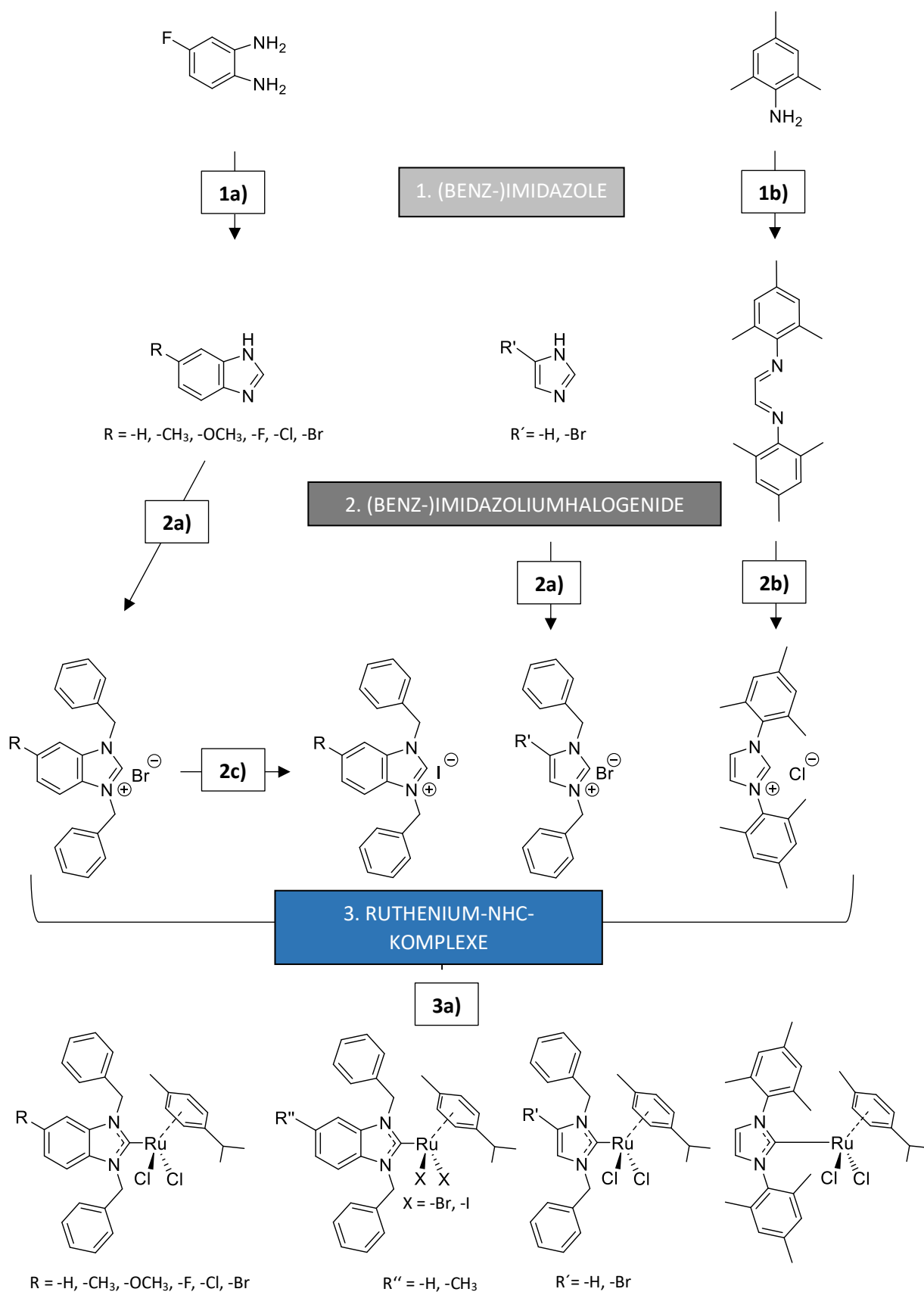
Ein Teil einer käuflich erworbenen 0,25 % Trypsinlösung, werden mit vier Teilen steriler PBS Lösung unter aseptischen Bedingungen vermischt.

Steriles Wasser

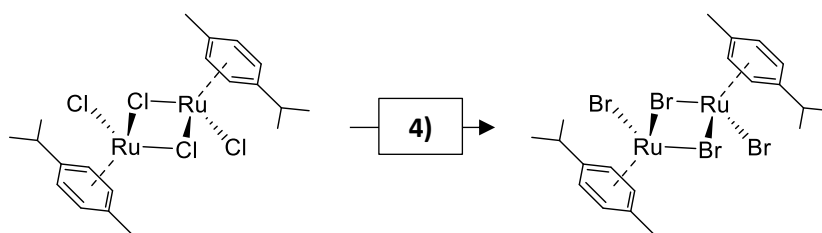
Reinstwasser wird in eine Glasflasche abgefüllt und die Lösung autoklaviert.

8.3. Synthesevorschriften

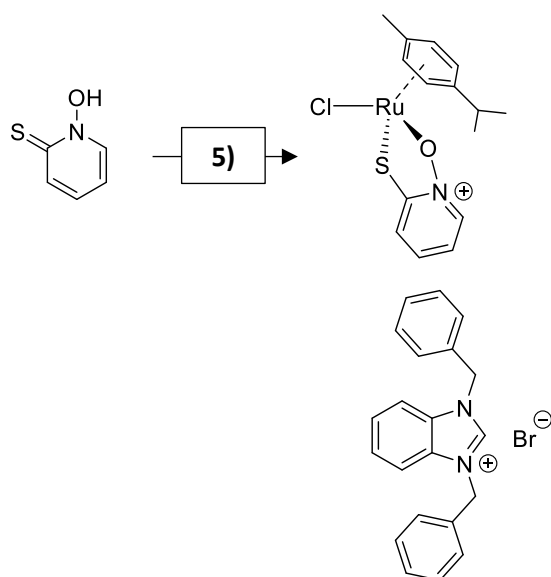
8.3.1 Allgemeines Syntheschema



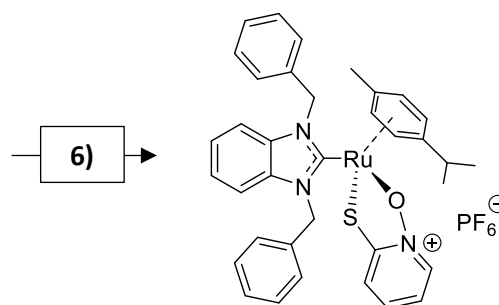
4. RUTHENIUM-DIHALOGENID-DIMERE



5. PYRITHION-RUTHENIUM



6. PYRITHION-RUTHENIUM-NHC-KOMPLEXE

8.3.2 Synthese des 5-Fluorbenzimidazols (Vorschrift **1a**)

Das 5-Fluorbenzimidazol wird in einer säure-katalysierten Ringschlusssynthese hergestellt. Hierzu wird das an der 4-Position substituierte 1,2-Diaminobenzol (ca. 2,3 mmol) unter Zusatz von 2 mL Salzsäure (36 %) in 10 mL Ameisensäure (98 %) gelöst. Der Ansatz wird 4 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird unter Eiskühlung mit konzentrierter Ammoniaklösung (25%) ein pH-Wert von 8-9 eingestellt und die erhaltene rotbraune Lösung dreimal mit 70 mL Ethylacetat extrahiert. In der Wasserphase verbleiben Ammoniumformiat und Ammoniumchlorid. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockne eingedunstet, wodurch das gewünschte Produkt erhalten wird.

8.3.3 Synthese des Dimesitylethan-1,2-diimins (**DAD**) (Vorschrift **1b**)

DAD wurde nach der bereits publizierten Methode mit folgenden Modifikationen synthetisiert. [228] Hierzu werden 3 ml Trimethylanilin in 50 mL 2-Propanol unter Zugabe von einigen Tropfen Essigsäure auf 50°C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur werden 0,5 Äquivalente Glyoxal gelöst in 5 mL 2-Propanol hinzugegeben. Der Ansatz wird über Nacht gerührt, wobei sich gelbe Kristalle bilden. Diese werden anschließend abfiltriert und getrocknet.

8.3.4 Synthese der (Benz-)Imidazoliumbromide (Vorschrift **2a**)

Die jeweiligen (Benz-)Imidazolderivate (ca. 2 mmol) werden in 50 mL Acetonitril gelöst, mit 2,5 Äquivalenten Kaliumcarbonat versetzt und bei RT für 30 min gerührt. Anschließend werden 2 Äquivalente Benzylbromid hinzugegeben. Der Ansatz wird bis zur vollständigen Umsetzung (Reaktionskontrolle mittels DC, FM: ACN) zu den gewünschten Produkten bei RT gerührt. Die Reaktionsdauer beträgt je nach Derivat 3-21 Tage.

Danach wird das Lösemittel unter Anlegen eines Vakuums entfernt. Der Rückstand wird in DCM resuspendiert und filtriert, wodurch überschüssiges Kaliumcarbonat entfernt wird. Die erhaltene Lösung wird erneut unter Vakuum eingeengt. Das daraufhin entstehende Öl, bestehend aus Produkt und Überschuss an Benzylbromid, wird mit Diethylether versetzt, wodurch das gewünschte Produkt als Niederschlag ausfällt. Bei Substanzen **2g** und **2h** ist zusätzliche die Behandlung im Ultraschallbad notwendig. Der Niederschlag wird wiederholt mit Diethylether gewaschen, bis der Überstand farblos erscheint und anschließend abfiltriert. Die nachfolgende Trocknung im Vakuum liefert das reine Produkt.

8.3.5 Synthese des Dimesitylimidazoliumchlorids (Vorschrift **2b**)

Dimesitylimidazoliumchlorid wurde nach der bereits publizierten Methode mit folgenden Modifikationen synthetisiert. [228] 80 mL Ethylacetat werden in einem Rundkolben auf 70°C erhitzt und mit 1,5 g DAD und 0,15 g Paraformaldehyd versetzt. 0,6 mL Chlortrimethylsilan werden in 5 mL Ethylacetat gelöst und tropfenweise zum ersten Reaktionsansatz gegeben. Diese Mischung wird 2 h bei 70°C gerührt und anschließend unter Eiskühlung auf 10°C abgekühlt. Der entstandene blass gelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

8.3.6 Synthese der Benzimidazoliumiodide (Vorschrift **2c**)

Die Benzimidazoliumiodide wurden nach der Methode von Hartinger et al. mit folgenden Modifikationen synthetisiert. [151] Das jeweilige Benzimidazoliumbromid (ca. 1 mmol) wird in 30 mL DCM gelöst und zu einer wässrigen Kaliumiodid-Lösung (ca. 84 mmol) gegeben. Das Zweiphasengemisch wird unter Lichtschutz für 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird die DCM-Phase abgelassen und die wässrige Phase dreimal mit 30 mL DCM gewaschen. Die organischen Phasen werden vereint und mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Dieses wird abfiltriert und das Filtrat unter Vakuum zur Trockne eingengt.

8.3.7 Synthese der Ruthenium(II)-NHC-Komplexe (Vorschrift **3**)

Die Metallkomplexe werden mittels einer Transmetallierungsreaktion nach hergestellt. [126] Hierfür werden die (Benz-)Imidazoliumhalogenide in DCM gelöst und mit 0,6 Äquivalenten Silberoxid versetzt. Der Ansatz wird unter Stickstoffatmosphäre und Lichtschutz für 12 h bei RT gerührt. Anschließend werden 0,5 Äquivalente des gewünschten Ruthenium(II)-Dimer (Dichloro, Dibromo- oder Diiodo-(*p*-Cymol)-Ruthenium(II)-Dimer) hinzugegeben und für weitere 2 – 21 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (FM: 5% MeOH in DCM). Nach erfolgreicher Umsetzung zum gewünschten Produkt wird der Ansatz über Celite® filtriert, um ausgefallenes Silberhalogenid abzutrennen. Das Filtrat wird bis unter Vakuum auf ca. 1 mL Lösung eingengt. Das gleiche Volumen Ethylacetat wird zum Ansatz hinzugegeben. In dieser Mischung kristallisieren die gewünschten Komplexe innerhalb von 2 Tagen als rote Kristalle aus. Das gewünschte Produkt **3e** wird erst nach einer weiteren Kristallisation erhalten.

Bei Substanzen **3b_{Br}**, **3b_I**, **3f** und **3i** ist nach der Filtration über Celite® zusätzlich eine Aufreinigung über eine Kieselgelsäule (FM: 5% MeOH in DCM) notwendig. Nach Eindampfen der Lösemittel im Vakuum wird das erhaltene braune Öl in einigen Tropfen DCM aufgenommen und mit kaltem *n*-Hexan ausgefällt. Zuletzt erfolgt eine Trocknung im Vakuum.

Bei den NHC-Diiodido-Rutheniumkomplexen **3a_I** und **3b_I** wird als Edukt das jeweilige Benzimidazoliumiodid eingesetzt, um den gewünschten Metallkomplex zu erhalten. Die Ursache hierfür ist in Kapitel 3.2.4 genauer erläutert.

8.3.8 Synthese des Dibromo(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimers (Vorschrift 4)

Es werden 100 mg Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer in 30 mL Methanol gelöst und mit 330 mg Silbernitrat versetzt. Der Ansatz wird unter Ausschluss von Licht für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird entstandenes Silberchlorid abfiltriert und 500 mg Kaliumbromid dem Filtrat hinzugegeben. Diese Lösung wird erneut über 12 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt.

Nachfolgend wird das Methanol abrotiert, der Niederschlag in Aceton aufgenommen und entstandenes Kaliumnitrat abfiltriert. Die Lösung wird unter Vakuum eingeeengt. Zum Schluss erfolgt eine Filtration über Celite® (Auszugsmittel: DCM) und ein erneutes Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer, um das Produkt zu erhalten.

8.3.9 Synthese des Ruthenium(II)-Pyrrithion-Komplexes (Vorschrift 5)

Das Produkt wurde nach der Methode von Kljun et al. durchgeführt. [146] 220 mg $[(p\text{-Cym})\text{RuCl}_2]_2$ werden zusammen mit 100,5 mg 2-Mercaptopyridin-*N*-oxid und 36,9 mg Natriummethanolat in 35 mL getrocknetem Aceton gelöst, wodurch eine dunkelbraune Lösung entsteht. Diese wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird das Aceton unter Vakuum entfernt und der Überstand über eine Kieselgel chromatographisch aufgereinigt (Elutionsmittel: 5 % Aceton in DCM). Die entsprechende Fraktion wird unter Vakuum eingeeengt, der Rückstand in wenig DCM gelöst und der Komplex mit kaltem *n*-Hexan als roter Niederschlag ausgefällt. Dieser wird abfiltriert und unter Vakuum getrocknet.

8.3.10 Synthese der Ruthenium(II)-NHC-Pyrrithion-Komplexe (Vorschrift 6)

Ruthenium-Pyrrithion wird mit äquimolarer Menge Silberhexafluorophosphat in 30 mL Acetonitril bei RT unter Lichtausschluss gerührt. In einem weiteren Ansatz wird das entsprechende Benzimidazoliumbromid mit einer äquimolaren Menge Silberoxid in 30 mL Acetonitril bei RT unter Lichtausschluss umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wird der erste Reaktionsansatz über Celite® filtriert, um entstandenes Silberchlorid zu entfernen. Das Filtrat wird eingeeengt und dieses zum zweiten Reaktionsgemisch gegeben. Dieses wird für weitere 48 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Im Anschluss wird die Lösung über Celite® filtriert, um überschüssiges Silberbromid zu entfernen und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt

säulenchromatographisch an Kieselgel (Elutionsmittel: 2% MeOH in DCM). Anschließendes Entfernen des Lösemittels und Trocknen unter Vakuum liefert den reinen Komplex.

8.4. Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Analytik der synthetisierten Verbindungen aufgelistet. Die Abkürzungen innerhalb der Zuordnung der Signale der NMR-Spektren und Bezifferungen im Molekül lassen sich der folgenden Abbildung entnehmen:

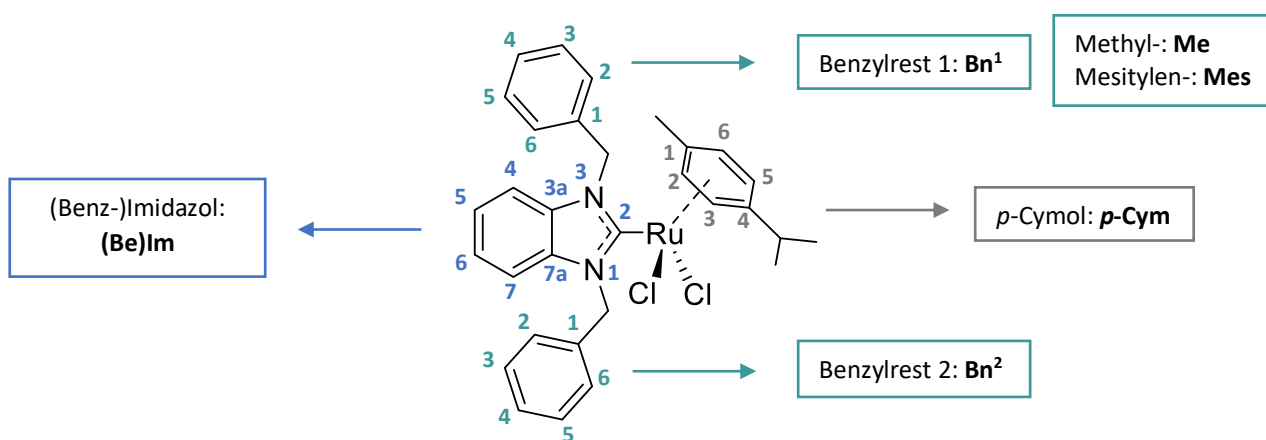
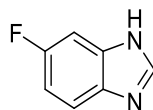


Abb. 88: Abkürzungen und Bezifferungen in den nachfolgend vorgestellten Strukturen.

8.4.1 (Benz-)Imidazole und weitere Vorstufen der NHC- Liganden

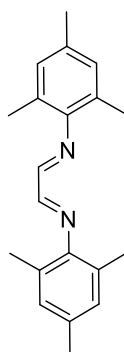
5-Fluor-1H-benzimidazol (1d)



Synthese nach Vorschrift **1a**, Ausgangssubstanz: 1,2-Diamino-4-fluorobenzen (285.9 mg, 2.05 mmol), Reaktionszeit: 4 h, Ausbeute: 240.5 mg (1.77 mmol, 77.9 %), violette Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 8.13 (s, Belm-H2, 1H), 7.60 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.8 Hz, $^4J_{\text{H,F}}$ = 4.7 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.5 Hz, Belm-H7, 1H), 7.33 (ddd, $^3J_{\text{H,F}}$ = 8.9 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.5 Hz, Belm-H4, 1H), 7.06 (ddd, $^3J_{\text{H,F}}$ = 9.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.8 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.4 Hz, Belm-H6, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 159.71 (d, $^1J_{\text{C,F}}$ = 238.9 Hz, Belm-C5_{quart.}), 141.81 (Belm-C2), 137.72 (Belm-C3a_{quart.}), 134.53 (Belm-C7a_{quart.}), 116.28 (Belm-C7), 111.46 (d, $^2J_{\text{C,F}}$ = 25.8 Hz, Belm-C6), 101.33 (d, $^2J_{\text{C,F}}$ = 25.7 Hz, Belm-C4); $^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, CDCl_3-d_1) δ -119.98;

Elementaranalyse $C_7H_5FN_2$ (theoretisch/gefunden [%]): C (61,76/61,67), H (3,70/3,70), N (20,58/20,26); MS (EI): m/z 136.1 $[M]^+$.

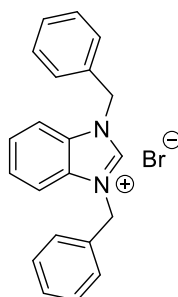
Dimesitylethan-1,2-diimin (DAD)



Synthese nach Vorschrift **1b**, Ausgangssubstanz: Glyoxal (1.2 ml, 26.78 mmol), Reaktionszeit: 12 h, Ausbeute: 6.6 g (22.63 mmol, 84.5 %), gelbes Pulver; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ 8.10 (s, N-CH-CH-N, 2H), 6.91 (q, $^4J_{H,H} = 0.8$ Hz, Mes-H3+H5, 4H), 2.29 (s, Mes-C4-CH₃, 6H), 2.16 (s, Mes-C2+C6-CH₃, 12H); ^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = 163.48 (N-C-C-N), 147.43 (Mes-C1_{quart.}), 134.25 (Mes-C4_{quart.}), 128.97 (Mes-C3+C5), 126.55 (Mes-C2+C6_{quart.}), 20.76 (Mes-C4-CH₃), 18.20 (Mes-C2+C6-CH₃); Elementaranalyse $C_{20}H_{24}N_2$ (theoretisch/gefunden [%]): C (82,15/82,05), H (8,27/8,25), N (9,58/9,37); MS (ESI): m/z 607.38 $[M+M+Na]^+$, 315.18 $[M+Na]^+$, 677.23 $[M+H]^+$.

8.4.2 (Benz-)Imidazoliumhalogenide

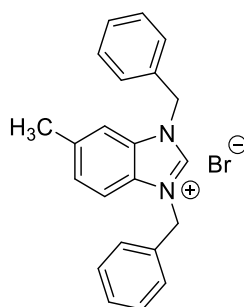
1,3-Dibenzyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (2a)



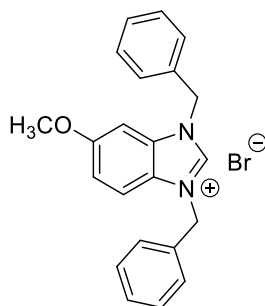
Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 1*H*-Benzimidazol (301.5 mg, 2.55 mmol), Reaktionszeit: 3 Tage, Ausbeute: 324.9 mg (0.86 mmol, 33.6 %), weißes Pulver; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = 12.05 (s, Belm-H2, 1H), 7.57 (d, $J_{H,H} = 3.2$ Hz, Belm-H4-H7, 1H), 7.57 – 7.55 (m, Belm-H4-H7, 1H), 7.53 (dd, $J_{H,H} = 1.4, 0.8$ Hz, Belm-H4/H7, 1H), 7.52 – 7.51 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 4H), 7.50 (d, $J_{H,H} = 3.2$ Hz, Belm-H4/H7, 1H), 7.41 – 7.32 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 6H), 5.88 (s, Bn¹/Bn²-CH₂, 4H);

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 143.24 (Belm-C2), 132.41 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 131.35 (Belm-C3a_{quart.}+C7a_{quart.}), 129.47 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2-C6}$), 129.38 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2-C6}$), 128.32 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2-C6}$), 127.20 (Belm-C4-C7), 113.72 (Belm-C4-C7), 51.59 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-CH}_2$); Elementaranalyse $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrN}_2$ (theoretisch/gefunden [%]): C (66,50/66,63), H (5,05/5,01), N (7,39/7,12); MS (ESI): m/z 299.2 $[\text{M-Br}]^+$, 477.23 $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+2\text{MeOH}]^+$, 677.23 $[\text{M}+\text{M-Br}]^+$.

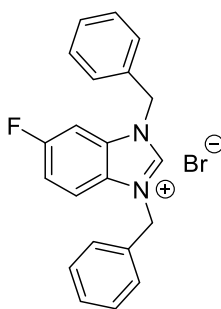
1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (2b)



Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 5-Methyl-1*H*-benzimidazol (300.5 mg, 2.27 mmol), Reaktionszeit: 3 Tage, Ausbeute: 624.6 mg (1.59 mmol, 69.8 %), weiß-gelbliches Pulver; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 11.83 (s, Belm-H2, 1H), 7.52 – 7.48 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H2+H6}$, 4H), 7.44 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.7 Hz, Belm-H7, 1H), 7.36 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H3-H5}$, 6H), 7.34 (m, Belm-H4, 1H), 7.30 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.1 Hz, Belm-H6, 1H), 5.85 (s, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 2H), 5.83 (s, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 2H), 2.45 (s, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.7 Hz, Belm-CH₃, 3H); ^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 142.55 (Belm-C2), 138.09 (Belm-C5_{quart.}), 132.60 ($\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 132.56 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 131.61 (Belm-C7a_{quart.}), 129.39 (Belm-C3a_{quart.}), 129.36 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 129.33 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 129.19 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 129.18 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 128.79 (Belm-C6), 128.24 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 128.17 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 113.27 (Belm-C7), 113.08 (Belm-C4), 51.46 ($\text{Bn}^1\text{-CH}_2$), 51.24 ($\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 21.76 (Belm-CH₃); Elementaranalyse $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrN}_2$ (theoretisch/gefunden [%]): C (67,18/67,08), H (5,38/5,55), N (7,12/7,10); MS (ESI): m/z 313.17 $[\text{M-Br}]^+$, 493.26 $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+2\text{MeOH}]^+$, 707.26 $[\text{M}+\text{M-Br}+2\text{H}^+]^+$.

1,3-Dibenzyl-5-methoxy-1*H*-benzimidazoliumbromid (2c)

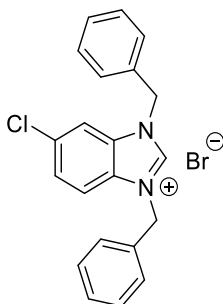
Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 5-Methoxy-1*H*-benzimidazol (250.0 mg, 1.69 mmol), Reaktionszeit: 3 Tage, Ausbeute: 131.7 mg (0.32 mmol, 19.1 %), weiß-gräuliches Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 11.62 (s, Belm-H2, 1H), 7.53 (m, Bn¹-H2+H6, 2H), 7.48 (m, Bn²-H2+H6, 2H), 7.43 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.1 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, Belm-H7, 1H), 7.36 (m, Bn²-H3-H5, 3H), 7.33 (m, Bn¹-H3-H5, 3H), 7.05 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.1 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, Belm-H6, 1H), 7.02 (dd, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, Belm-H4, 1H), 5.86 (s, Bn²-CH₂, 2H), 5.81 (s, Bn¹-CH₂, 2H), 3.80 (s, Belm-OCH₃, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 159.3 (Belm-C5_{quart.}), 141.9 (Belm-C2), 132.61 (Bn²-C1_{quart.}), 132.55 (Bn¹-C1_{quart.}), 132.54 (Belm-C7a_{quart.}), 129.31 (Bn¹+Bn²-C2-C4), 129.29 (Bn¹+Bn²-C2-C4), 129.18 (Bn¹+Bn²-C2-C4), 129.14 (Bn¹+Bn²-C2-C4), 128.30 (Bn²-C1,C5), 128.19 (Bn¹-C1,C5), 125.34 (Belm-C3a_{quart.}), 117.21 (Belm-C6), 114.4 (Belm-C7), 96.18 (Belm-C4), 56.2 (Belm-OCH₃), 51.5 (Bn¹-CH₂), 51.2 (Bn²-CH₂); Elementaranalyse C₂₂H₂₁BrN₂O (theoretisch/gefunden [%]): C (64,56/64,82), H (5,17/5,14), N (6,84/6,78); MS (ESI): m/z 329.2 [M-Br]⁺, 509.26 [M+2H₂O+2MeOH]⁺, 737.25 [M+M-Br]⁺.

1,3-Dibenzyl-5-fluoro-1*H*-benzimidazoliumbromid (2d)

Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 5-Fluoro-1*H*-benzimidazol (269.5, 1.98 mmol), Reaktionszeit: 10 Tage, Ausbeute: 432.0 mg (1.09 mmol, 54.9%), graues Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 11.98 (s, Belm-H2, 1H), 7.55 (dd, $^3J_{\text{H,F}}$ = 4.4 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, Belm-H6, 1H), 7.54 – 7.50 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 4H), 7.41 – 7.33 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 6H), 7.24 – 7.21 (m, Belm-H7, 1H), 7.20 (d, $^3J_{\text{H,F}}$ = 2.0 Hz, Belm-H4, 1H), 5.91 (s, Bn¹/Bn²-CH₂, 2H), 5.86 (s, Bn¹/Bn²-CH₂, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 161.14 (d, $^1J_{\text{C,F}}$ = 249.7 Hz, Belm-C5_{quart.}), 144.39 (Belm-C2), 132.21 (Bn¹-C1_{quart.}), 132.02 (Bn²-C1_{quart.}), 131.93 (Belm-C7a_{quart.}), 129.52 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 129.46 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 129.40

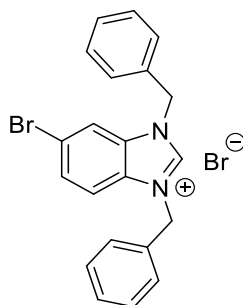
(Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.34 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.33 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 127.82 (Belm-C3a_{quart.}), 116.17 (d, ³J_{C,F} = 26.2 Hz, Belm-C4), 115.39 (d, ⁴J_{C,F} = 10.1 Hz, Belm-C7), 100.77 (d, ³J_{C,F} = 28.3 Hz, Belm-C6), 51.93 (Bn¹-CH₂), 51.90 (Bn²-CH₂); Elementaranalyse C₂₁H₁₈BrFN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (63,49/63,22), H (4,57/4,55), N (7,05/6,64); Masse (ESI): m/z 317.14 [M-Br]⁺, 497.24 [M+2H₂O+2MeOH]⁺, 713.21 [M+M-Br]⁺.

1,3-Dibenzyl-5-chloro-1*H*-benzimidazoliumbromid (2e)



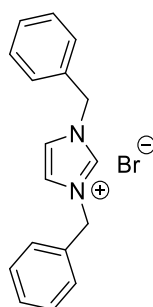
Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 5-Chloro-1*H*-benzimidazol (299.3 mg, 1.97 mmol), Reaktionszeit: 21 Tage, Ausbeute: 306.0 mg (0.74 mmol, 37.7 %), weiß-gelbes Pulver; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 12.00 (s, Belm-H2, 1H), 7.53 (dd, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, ³J_{H,H} = 1.0 Hz, Belm-H6, 1H), 7.51 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 4H), 7.50 (dd, ³J_{H,H} = 7.7, ⁵J_{H,H} = 0.6 Hz, Belm-H7, 1H), 7.43 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, Belm-H4, 1H), 7.41 – 7.33 (m, Bn¹/Bn²-H2-H6, 6H), 5.90 (s, Bn¹-CH₂, 2H), 5.85 (s, Bn²-CH₂, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 144.32 (Belm-C2), 133.51 (Belm-C7a_{quart.}), 132.17 (Bn¹-C1_{quart.}), 132.03 (Bn²-C1_{quart.}), 132.02 (Belm-C3a_{quart.}), 129.94 (Belm-C5_{quart.}), 129.54 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 129.49 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 129.47 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 129.42 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.34 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.30 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 127.99 (Belm-C4), 114.96 (Belm-C6), 113.68 (Belm-C7), 51.94 (Bn¹-CH₂), 51.83 (Bn²-CH₂); Elementaranalyse C₂₁H₁₈BrClN₂ (theoretisch/gefunden [%]): C (60,96/60,62), H (4,39/4,56), N (6,77/6,49); MS (ESI): m/z 333.12 [M-Br]⁺, 513.21 [M+2H₂O+2MeOH]⁺, 747.15 [M+M-Br]⁺.

1,3-Dibenzyl-5-bromo-1*H*-benzimidazoliumbromid (2f)

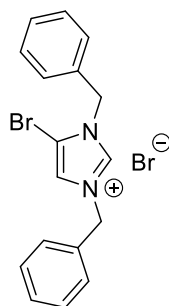


Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 5-Bromo-1*H*-benzimidazol (298.4 mg, 1.51 mmol), Reaktionszeit: 21 Tage, Ausbeute: 182.1 mg (0.40 mmol, 26.2 %), orangenes Pulver; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 11.98 (s, Belm-H2, 1H), 7.68 (dd, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.6 Hz, Belm-H4, 1H), 7.58 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, Belm-H6, 1H), 7.52 (t, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, Bn2-H3+H5, 2H), 7.51 (dd, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, Bn¹-H3+H5, 2H), 7.46 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.6 Hz, Belm-H7, 1H), 7.42 – 7.38 (m, Bn²-H2+H4+H6, 3H), 7.38 – 7.34 (m, Bn²-H2+H4+H6, 3H), 5.89 (s, Bn¹-CH₂, 2H), 5.84 (s, Bn²-CH₂, 2H); ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 144.06 (Belm-C2), 132.38 (Belm-C7a_{quart.}), 132.16 (Bn¹-C1_{quart.}), 132.01 (Bn²-C1_{quart.}), 130.66 (Belm-C6), 130.33 (Belm-C3a_{quart.}), 129.56 (Bn¹+Bn²-C2+C4+C6), 129.51 (Bn¹+Bn²-C2+C4+C6), 129.47 (Bn¹+Bn²-C2+C4+C6), 129.43 (Bn¹+Bn²-C2+C4+C6), 128.35 (Bn¹+Bn²-C3+C5), 128.30 (Bn¹+Bn²-C3+C5), 120.81 (Belm-C5_{quart.}), 116.63 (Belm-C4), 115.22 (Belm-C7), 51.90 (Bn¹-CH₂), 51.78 (Bn²-CH₂); Elementaranalyse C₂₁H₁₈Br₂N₂ (theoretisch/gefunden [%]): C (55,05/55,31), H (3,96/3,72), N (6,11/5,95); MS (ESI): m/z 377.10 [M-Br]⁺

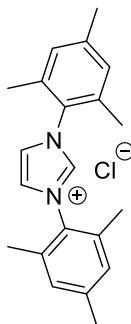
1,3-Dibenzyl-1*H*-imidazoliumbromid (2g)



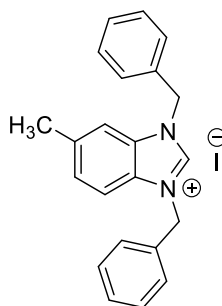
Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 1*H*-Imidazol (307.7 mg, 4.52 mmol), Reaktionszeit: 3 Tage, Ausbeute: 1251,9 mg (3.80 mmol, 86,8 %), weißes Pulver; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 10.78 (t, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, Im-H2, 1H), 7.50 – 7.45 (m, Bn¹+Bn²-H2-H6, 4H), 7.40 – 7.35 (m, Bn¹+Bn²-H2-H6, 6H), 7.26 (d, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, Im-H4+H5, 2H), 5.56 (s, Bn¹+Bn²-CH₂, 4H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 137.08 (Im-C2), 132.72 (Bn¹+Bn²-C1_{quart.}), 129.52 (Bn¹+Bn²-C2-C6), 129.44 (Bn¹+Bn²-C2-C6), 129.02 (Bn¹+Bn²-C2-C6), 53.44 (Bn¹+Bn²-CH₂); Elementaranalyse C₁₇H₁₇BrN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (62,02/61,80), H (5,20/5,25), N (8,51/8,46); MS (ESI): m/z 249.14 [M-Br]⁺, 577.20 [M+M-Br]⁺.

1,3-Dibenzyl-4-bromo-1*H*-imidazoliumbromid (2h)

Synthese nach Vorschrift **2a**, Ausgangssubstanz: 4-Bromo-1*H*-imidazol (297.7 mg, 2.03 mmol), Reaktionszeit: 3 Tage, Ausbeute: 290.6 mg (0.71 mmol, 35.2%), weißes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 11.33 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, Im-H2, 1H), 7.56 – 7.52 (m, Bn¹-H2+H6, 2H), 7.52 – 7.48 (m, Bn²-H2+H6, 2H), 7.42 – 7.39 (m, Bn¹-H3-H5, 3H), 7.39 – 7.35 (m, Bn²-H3-H5, 3H), 7.33 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.8 Hz, Im-H5, 1H), 5.66 (s, Bn²-CH₂, 2H), 5.53 (s, Bn¹-CH₂, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 138.97 (Im-C2), 132.25 (Bn²-C1_{quart.}), 132.13 (Bn¹-C1_{quart.}), 129.76 (Bn¹-C3-C5), 129.53 (Bn¹-C3-C5), 129.41 (Bn²-C3-C5), 129.37 (Bn²-C3-C5), 129.31 (Bn¹-C2/C6), 128.67 (Bn²-C2/C6), 121.94 (Im-C5), 107.85 (Im-C4_{quart.}), 54.16 (Bn²-CH₂), 52.38 (Bn¹-CH₂); Elementaranalyse C₁₇H₁₆Br₂N₂ (berechnet/gefunden [%]): C (50,03/50,96), H (3,95/4,08), N (6,86/6,57); MS (ESI): m/z 327.05 [M-Br]⁺, 417.10 [M+2H₂O+2MeOH]⁺, 735.01 [M+M-Br+2H]⁺.

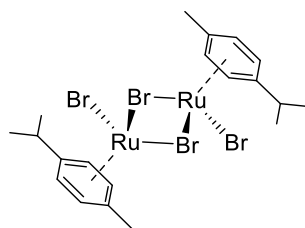
1,3-Dimesityl-1*H*-imidazoliumchlorid (2i)

Synthese nach Vorschrift **2b**, Ausgangssubstanz: Dimesitylethan-1,2-diimin (1.5 g, 5.13 mmol), Reaktionszeit: 2 h, Ausbeute: 1.12 g (3.24 mmol, 63.2 %), gelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 10.87 (t, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, Im-H2, 1H), 7.67 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, Im-H4+H5, 2H), 7.01 (q, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.8 Hz, Mes-CH, 4H), 2.33 (s, Mes-CH₃, 6H), 2.17 – 2.16 (m, Mes-CH₃, 12H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 141.15 (Mes-C4_{quart.}), 139.59 (Im-C2), 134.00 (Mes-C2+C6_{quart.}), 130.59 (Mes-C1_{quart.}), 129.82 (Mes-C3+C5), 124.47 (Im-C3+C4), 21.08 (Mes-CH₃), 17.60 (Mes-CH₃); Elementaranalyse C₂₁H₂₅ClN₂ (theoretisch/gefunden [%]): C (73,99/73,72), H (7,39/7,32), N (8,22/7,99); MS (ESI): m/z 305.20 [M-Br]⁺, 645.37 [M+M-Br]⁺.

1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumiodid (**2b**)

Synthese nach Vorschrift **2c**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (456.6 mg, 1.16 mmol), Reaktionszeit: 2 Tage, Ausbeute: 247.3 mg (0.56 mmol, 48.4 %), weiß-gelbliches Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 11.28 (s, Belm-H2, 1H), 7.53 – 7.49 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H2+H6}$, 4H), 7.44 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, Belm-H7, 1H), 7.41 – 7.36 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H3-H5}$, 6H), 7.35 (m, Belm-H4, 1H) 7.31 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, Belm-H6, 1H), 5.82 (s, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 2H), 5.81 (s, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 2H), 2.46 (s, $^3J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, Belm- CH_3 , 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 141.49 (Belm-C2), 138.26 (Belm-C5), 132.37 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 132.32 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 131.67 (Belm-C7a_{quart.}), 129.45 (Belm-C3a_{quart.}), 129.43 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 129.40 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 129.30 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 128.96 (Belm-C6), 128.35 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 128.29 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 113.30 (Belm-C7), 113.11 (Belm-C4), 51.59 ($\text{Bn}^1\text{-CH}_2$), 51.35 ($\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 21.80 (Belm- CH_3); Elementaranalyse $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{IN}_2$ (theoretisch/gefunden [%]): C (60,01/59,55), H (4,81/4,68), N (6,36/6,17); MS (ESI): m/z 439.1 [M-H] $^+$ 313.2 [M-I] $^+$.

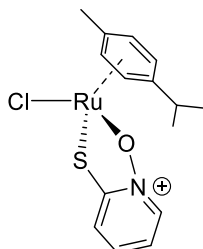
8.4.3 Rutheniumfragmente

Dibromido-*p*-cymol-ruthenium(II)-dimer ([(*p*-Cym)RuBr $_2$] $_2$)

Synthese nach Vorschrift **4**, Ausgangssubstanz: Dichloro-*p*-cymol-ruthenium(II)-dimer (100.3 mg, 0.16 mmol), Reaktionszeit: 12 h, Ausbeute: 116.7 mg (0.15 mmol, 90.2 %), hellrotes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 5.50 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.9 Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 5.38 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.9 Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 2.96 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 2.22 (s, *p*-Cym- CH_3 , 3H), 1.27 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH- CH_3 , 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3-d_1) δ = ppm 102.13 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 96.78 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 81.34 (*p*-Cym-C3+C5), 81.16 (*p*-Cym-C2+C6), 30.82 (*p*-Cym-CH), 22.28 (*p*-Cym-CH- CH_3), 19.37

(*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₂₀H₂₈Br₄Ru₂ (berechnet/gefunden [%]): C (30,40/30,32), H (3,57/3,55); MS (EI): *m/z* 791.70 [M+4H]⁺.

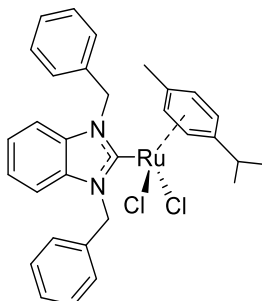
Chlorido-2-mercaptopyridinium-*N*-oxid-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (Pth-Ru)



Synthese nach Vorschrift **5**, Ausgangssubstanz: 2-Mercaptopyridin-*N*-oxid (102.8 mg, 0.81 mmol), Reaktionszeit: 12 h, Ausbeute: 154.0 mg (0.39 mmol, 47.9 %), hellrotes Pulver; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 8.04 (dd, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.3 Hz, Pth-H6, 1H), 7.44 (dd, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.7 Hz, Pth-H3, 1H), 7.03 (ddd, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ³*J*_{H,H} = 7.0, ⁴*J*_{H,H} = 1.3 Hz, Pth-H4, 1H), 6.72 (td, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.8 Hz, Pth-H5, 1H), 5.52 – 5.43 (m, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 5.32 – 5.18 (m, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 2.83 (hept, *J* = 6.9 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 2.25 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.27 (d, *J* = 6.9 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 160.56 (Pth-C2), 137.12 (Pth-C6), 129.36 (Pth-C4), 127.71 (Pth-C3), 117.35 (Pth-C5), 100.56 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 98.65 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 82.29 (*p*-Cym-C2+C6), 80.89 (*p*-Cym-C3+C5), 30.88 (*p*-Cym-CH), 22.44 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.50 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₁₅H₁₈ClNORuS (theoretisch/gefunden [%]): C (45,39/45,30), H (4,57/4,48), N (3,53/3,47); MS (ESI): *m/z* 362.02 [M-Cl]⁺.

8.4.4 Ruthenium(II)-NHC-Komplexe

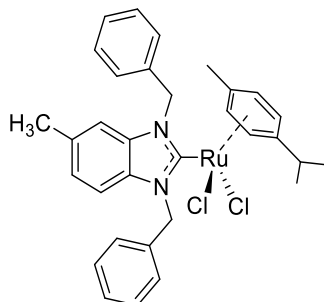
(1,3-Dibenzyl-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (3a)



Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (80.0 mg, 0.21 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 81.0 mg (0.13 mmol, 63.3 %), orange-rote Kristalle; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 7.38 – 7.33 (m, Bn¹+Bn²-H2+H6, 4H), 7.32 – 7.28 (m, Bn¹+Bn²-H4, 2H), 7.14 – 7.11 (m, Bn¹+Bn²-H3+H5, 4H),

7.09 – 7.06 (m, Belm-H4-H7, 2H), 7.03 (m, Belm-H4-H7, 2H), 6.56 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.1$ Hz, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 2H), 5.84 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.1$ Hz, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 2H), 5.35 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $p\text{-Cym-H3+H5}$, 2H), 5.06 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $p\text{-Cym-H2+H6}$, 2H), 2.73 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $p\text{-Cym-CH}$, 1H), 1.89 (s, $p\text{-Cym-CH}_3$, 3H), 1.17 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 191.69$ (Belm-C2_{quart.}), 137.47 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 135.54 (Belm-C3a_{quart.}+C7a_{quart.}), 128.92 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$) 127.48 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-C4}$), 125.93 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-C3+C5}$), 123.12 (Belm-C4-C7), 111.64 (Belm-C4-C7), 107.99 ($p\text{-Cym-C4}_{\text{quart.}}$), 97.23 ($p\text{-Cym-C1}_{\text{quart.}}$), 85.44 ($p\text{-Cym-C3+C5}$), 84.63 ($p\text{-Cym-C2+C6}$), 52.97 ($\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 30.61 ($p\text{-Cym-CH}$), 22.47 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 18.28 ($p\text{-Cym-CH}_3$); Elementaranalyse $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (61,59/61,44), H (5,34/5,34) N (4,63/4,68); MS (ESI): m/z 1173.23 [$\text{M}+\text{M-Cl}$] $^+$, 569.13 [M-Cl] $^+$, 399.04 [$\text{M-2Cl-}p\text{-Cym-H}$] $^+$.

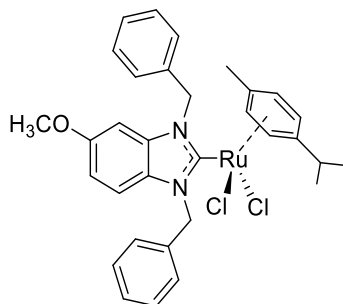
(1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3b**)



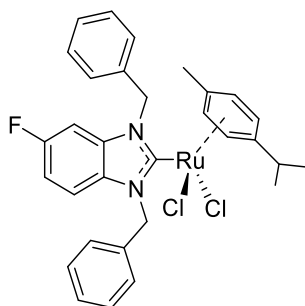
Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (132.9 mg, 0.34 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 138.4 mg (0.22 mmol, 66.2 %), rote Kristalle; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 7.39 - 7.33$ (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H3+H5}$, 4H), 7.32 – 7.27 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H4}$, 2H), 7.14 – 7.10 (m, $\text{Bn}^1+\text{Bn}^2\text{-H2+H6}$, 4H), 6.89 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, Belm-H4+H7, 2H), 6.83 (m, Belm-H6, 1H), 6.60 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.2$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 6.51 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.1$ Hz, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.81 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.1$ Hz, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.73 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.2$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.33 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $p\text{-Cym-H3+H5}$, 2H), 5.04 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $p\text{-Cym-H2+H6}$, 2H), 2.70 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $p\text{-Cym-CH}$, 1H), 2.30 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1$ Hz, Belm-CH3, 3H), 1.87 (s, $p\text{-Cym-CH}_3$, 3H), 1.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 190.59$ (Belm-C2_{quart.}), 137.69 ($\text{Bn}^1\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 137.57 ($\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 135.91 (Belm-C3a_{quart.}), 133.76 (Belm-C7a_{quart.}), 133.30 (Belm-C5_{quart.}), 128.92 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3/C5}$), 128.87 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3/C5}$), 127.41 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2}$), 127.39 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2}$), 125.95 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2/C6}$), 125.80 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2/C6}$), 124.46 (Belm-C4), 111.44 (Belm-C6), 111.22 (Belm-C7), 107.73 ($p\text{-Cym-C4}_{\text{quart.}}$), 97.12 ($p\text{-Cym-C1}_{\text{quart.}}$), 85.31 ($p\text{-Cym-C3+C5}$), 84.61 ($p\text{-Cym-C2+C6}$), 52.96 ($\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 52.56 ($\text{Bn}^1\text{-CH}_2$), 30.58 ($p\text{-Cym-CH}$), 22.54 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 22.42 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 21.41 (Belm-CH3), 18.21 ($p\text{-Cym-CH}_3$); Elementaranalyse $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]):

C (62,13/62,29), H (5,54/5,58) N (4,53/4,50); MS (ESI): m/z 583.15 $[M-Cl]^+$, 548.19 $[M-2Cl]^+$, 413.06 $[M-2Cl-p-Cym-H]^+$.

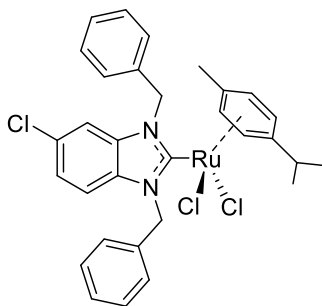
(1,3-Dibenzyl-5-methoxy-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (3c)



Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-methoxy-1*H*-benzimidazoliumbromid (65.0 mg, 0.16 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 49.7 mg (0.08 mmol, 49.3 %), orange-rote Kristalle; ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.36 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H}_2+\text{H}_6$, 4H), 7.32 – 7.27 (m, 2H, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H}_4$, 2H), 7.16 – 7.11 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H}_3+\text{H}_5$, 4H), 6.88 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.9 Hz, Belm-H7, 1H), 6.67 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.9 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, Belm-H6, 1H), 6.47 (d, $^4J_{\text{H,H}}$ = 2.3 Hz, Belm-H4, 1H), 6.57 (m, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 6.52 (m, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.83 (m, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.80 (m, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.34 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.05 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 3.62 (s, Belm-OCH₃, 3H), 2.73 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 1.90 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.17 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); ^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 190.25 (Belm-C2_{quart.}), 156.46 (Belm-C5_{quart.}), 137.52 ($\text{Bn}^1\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 137.36 ($\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 136.42 (Belm-C7a_{quart.}), 130.18 (Belm-C3a_{quart.}), 128.93 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 128.88 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 127.49 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C4}$), 127.46 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C4}$), 126.03 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3+C5}$), 126.00 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3+C5}$), 112.14 (Belm-C6), 111.50 (Belm-C7), 107.90 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.22 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 95.73 (Belm-C4), 85.36 (*p*-Cym-C3+C5), 84.51 (*p*-Cym-C2+C6), 55.73 (Belm-OCH₃), 53.05 ($\text{Bn}^1\text{-CH}_2$), 52.86 ($\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 30.60 (*p*-Cym-CH), 22.48 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.29 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₃₂H₃₄Cl₂N₂ORu (berechnet/gefunden [%]): C (60,57/60,95), H (5,40/5,40) N (4,41/4,41); MS (ESI): m/z 599.14 $[M-Cl]$, 465.03 $[M-Cl-p-Cym]$, 429.05 $[M-2Cl-p-Cym-H]$, 329.17 $[M-2Cl-p-Cym-Ru]$.

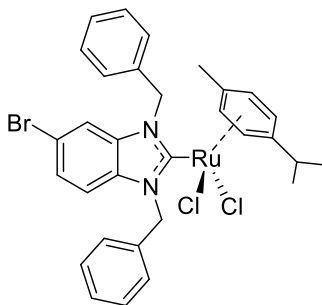
(1,3-Dibenzyl-5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (3d)

Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-fluoro-1*H*-benzimidazoliumbromid (130.5 mg, 0.33 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 4 Tage (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 100.2 mg (0.18 mmol, 49.0 %), oranges Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.41 – 7.34 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H2+H6}$, 4H), 7.31 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H3-H5}$, 2H), 7.15 – 7.09 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H3-H5}$, 4H), 6.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.9$ Hz, $^4J_{\text{H,F}} = 4.3$ Hz, Belm-H7, 1H), 6.81 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 8.9$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 5.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, Belm-H6, 1H), 6.71 (dd, $^3J_{\text{H,F}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, Belm-H4, 1H), 6.53 (s, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 6.50 (s, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.84 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 18.4$ Hz, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.78 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.7$ Hz, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.08 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 2.73 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 1.91 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.18 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 193.72 (Belm-C2), 159.24 (d, $J = 243.2$ Hz, Belm-C5), 137.11 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 136.81 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 135.92 (d, $J = 12.2$ Hz, Belm-C7a_{quart.}), 132.03 (Belm-C3a_{quart.}), 129.07 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 129.01 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 127.73 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 127.65 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 125.92 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 125.90 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 112.35 (d, $J = 9.8$ Hz, Belm-C7), 111.21 (d, $J = 25.5$ Hz, Belm-C6), 108.18 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 98.84 (d, $J = 27.7$ Hz, Belm-C4), 97.30 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.45 (*p*-Cym-C3+C5), 84.79 (*p*-Cym-C2+C6), 53.27 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 53.18 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 30.64 (*p*-Cym-CH), 22.45 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.31 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (59,81/59,31), H (5,02/5,08) N (4,50/4,45); MS (ESI): m/z 587.12 [M-Cl], 552.16 [M-2Cl], 417.03 [M-2Cl-p-Cym-H].

(1,3-Dibenzyl-5-chloro-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (3e)

Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-chloro-1*H*-benzimidazoliumbromid (90.5 mg, 0.22 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 7 Tage (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 71.6 mg (0.11 mmol, 51.0%), orange-braune Kristalle; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 7.41 – 7.36 (m, Bn¹/Bn², H3-H5, 3H), 7.35 – 7.28 (m, Bn¹/Bn², H3-H5, 3H), 7.12 – 7.08 (m, Bn¹/Bn², H2+H6, 4H), 7.05 (dd, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, Belm-H6, 1H), 7.00 (dd, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.5 Hz, Belm-H4, 1H), 6.92 (dd, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.5 Hz, Belm-H7, 1H), 6.54 (m, Bn¹-CH₂, 1H), 6.51 (m, Bn²-CH₂, 1H), 5.84 (d, ²J_{H,H} = 17.2 Hz, Bn²-CH₂, 1H), 5.75 (d, ²J_{H,H} = 17.2 Hz, Bn¹-CH₂, 1H), 5.38 – 5.32 (m, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.07 (d, *J* = 6.1 Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 2.71 (hept, *J* = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 1.89 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 194.18 (Belm-C2, 1C), 137.02 (Bn2-C1_{quart.}), 136.88 (Bn1-C1_{quart.}), 136.16 (Belm-C7a_{quart.}), 134.14 (Belm-C5), 129.35 (Belm-C3a_{quart.}), 129.12 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 129.03 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 127.75 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 127.68 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 125.88 (Bn¹/Bn²-C2+C6), 125.78 (Bn¹/Bn²-C2+C6), 123.70 (Belm-C6), 112.45 (Belm-C7), 111.56 (Belm-C4), 108.19 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.36 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.49 (*p*-Cym-C3+C5), 84.86 (*p*-Cym-C2+C6), 53.23 (Bn²-CH₂), 52.99 (Bn¹-CH₂), 30.63 (*p*-Cym-CH), 22.45 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.27 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₃₁H₃₁Cl₃N₂Ru (berechnet/gefunden [%]): C (58,27/58,33), H (4,89/4,84) N (4,38/4,26); MS (ESI): *m/z* 603.09 [M-Cl], 1243.15 [M+M-Cl+2H], 433.00 [M-2Cl-*p*-Cym-H], 333.12 [M-2Cl-*p*-Cym-Ru].

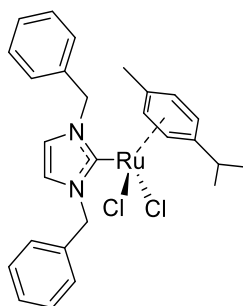
(1,3-Dibenzyl-5-bromo-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η⁶-*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3f**)



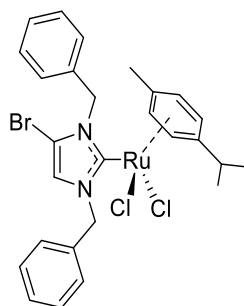
Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-bromo-1*H*-benzimidazoliumbromid (84.0 mg, 0.18 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 7 Tage (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 20.5 mg (0.03 mmol, 16.4 %), orange-rotes Pulver; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ = 7.41 – 7.38 (m, Bn²-H2+H6, 2H), 7.38 – 7.35 (m, Bn¹-H2+H6, 2H), 7.34 – 7.28 (m, Bn¹+Bn²-H4, 2H), 7.19 (dd, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, Belm-H6, 1H), 7.15 (m, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.45 Hz, Belm-H4, 1H), 7.12 – 7.10 (m, Bn¹/Bn²-H3+H5, 2H), 7.09 – 7.08 (m, Bn¹/Bn²-H3+H5, 2H), 6.87 (m, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.45 Hz, Belm-H7, 1H), 6.58 (d, ²J_{H,H} = 17.2 Hz, Bn²-CH₂, 1H), 6.52 (d, ²J_{H,H} = 17.1 Hz, Bn¹-CH₂, 1H), 5.85 (d, ²J_{H,H} = 17.1 Hz, Bn¹-CH₂, 1H), 5.73 (d, ²J_{H,H} = 17.2 Hz, Bn²-CH₂, 1H), 5.35 (d, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.06 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 2.75 – 2.66 (m, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, *p*-Cym-CH,

1H), 1.88 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.17 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 194.09 (Belm-C2), 137.01 (Bn¹-C1_{quart.}), 136.88 (Bn²-C1_{quart.}), 136.48 (Belm-C7a_{quart.}), 134.49 (Belm-C3a_{quart.}), 129.12 (Bn²-C2+C6), 129.02 (Bn¹-C2+C6), 127.74 (Bn¹/Bn²-C4), 127.65 (Bn¹/Bn²-C4), 126.40 (Belm-C6), 125.85 (Bn¹/Bn²-C3+C5), 125.74 (Bn¹/Bn²-C3+C5), 116.69 (Belm-C5), 114.36 (Belm-C4), 112.86 (Belm-C7), 108.16 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.34 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.47 (*p*-Cym-C3+C5), 84.86 (*p*-Cym-C2+C6), 53.18 (Bn¹-CH₂), 52.91 (Bn²-CH₂), 30.61 (*p*-Cym-CH), 22.47 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.25 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₃₁H₃₁BrCl₂N₂Ru (berechnet/gefunden [%]): C (54,48/54,38), H (4,57/4,48) N (4,10/4,01); MS (ESI): m/z 1331.05 [M+M-2Cl+2H]⁺, 649.04 [M-Cl+2H]⁺, 433.00 [M-2Cl-*p*-Cym+H]⁺.

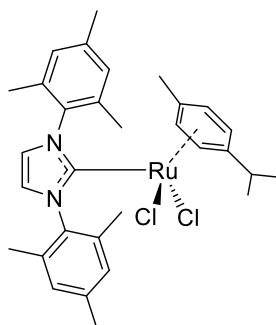
(1,3-Dibenzyl-1*H*-imidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η⁶-*p*-cymol)-ruthenium(II) (3g)



Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-1*H*-imidazoliumbromid (99.5 mg, 0.30 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 113.6 mg (0.20 mmol, 67.8 %), orange-rotes Pulver; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 7.41 – 7.35 (m, Bn¹+Bn²-H₂+H₆, 4H), 7.35 – 7.28 (m, Bn¹+Bn²-H₃-H₅, 6H), 6.82 (d, J_{H,H} = 1.7 Hz, Im-H₄+H₅, 2H), 5.85 (s, Bn¹+Bn²-CH₂, 2H), 5.67 (s, Bn¹+Bn²-CH₂, 2H), 5.39 – 5.33 (m, *p*-Cym-H₃+H₅, 2H), 5.07 – 5.02 (m, *p*-Cym-H₂+H₆, 2H), 2.87 (hept, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 2.03 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.23 (dd, ³J_{H,H} = 7.0, 1.7 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 175.55 (Im-C2), 137.41 (Bn¹+Bn²-C1_{quart.}), 128.84 (Bn¹+Bn²-C2+C6), 127.96 (Bn¹+Bn²-C3-C5), 127.81 (Bn¹+Bn²-C3-C5), 122.90 (Belm-C4+C5), 107.86 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.81 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.06 (*p*-Cym-C2+C6), 83.30 (*p*-Cym-C3+C5), 55.03 (Bn¹+Bn²-CH₂), 30.72 (*p*-Cym-CH), 22.57 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.69 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse C₂₇H₃₀Cl₂N₂Ru (berechnet/gefunden [%]): C (58,48/57,67), H (5,45/5,21) N (5,05/4,85); MS (ESI): m/z 1073.20 [M+M-Cl]⁺, 519.11 [M-Cl]⁺, 349.03 [M-2Cl-*p*-Cym-H]⁺.

(1,3-Dibenzyl-4-bromo-1*H*-imidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3h**)

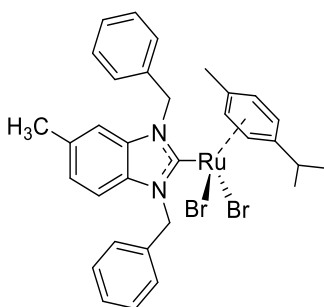
Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-4-bromo-1*H*-imidazoliumbromid (103.4 mg, 0.25 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 83.0 mg (0.13 mmol, 51.6 %), orange-rotes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 - d_1) δ = 7.44 – 7.42 (m, Bn^1/Bn^2 -H2-H6, 3H), 7.42 – 7.39 (m, Bn^1/Bn^2 -H2-H6, 3H), 7.38 – 7.36 (m, Bn^1/Bn^2 -H2-H6, 2H), 7.07 – 7.05 (m, Bn^1/Bn^2 -H2-H6, 2H), 6.89 (s, Im-H5, 1H), 6.71 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.0 Hz, Bn^1 -CH₂, 1H), 6.09 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.9 Hz, Bn^2 -CH₂, 1H), 5.45 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.9 Hz, Bn^2 -CH₂, 1H), 5.31 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.0 Hz, Bn^1 -CH₂, 1H), 5.24 (m, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.11 – 4.65 (m, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 2.76 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 1.94 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.19 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3 - d_1) δ = 179.17 (Im-C2_{quart.}), 138.52 (Bn^1/Bn^2 -C1_{quart.}), 136.37 (Bn^1/Bn^2 -C1_{quart.}), 129.00 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 128.98 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 128.36 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 128.27 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 127.46 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 125.27 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 125.19 (Bn^1/Bn^2 -C2-C6), 123.53 (Im-C5), 107.78 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.32 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.64 (*p*-Cym-C3/C5), 84.44 (*p*-Cym-C3/C5), 84.01 (*p*-Cym-C2/C6), 83.37 (*p*-Cym-C2/C6), 55.90 (Bn^2 -CH₂), 53.28 (Bn^1 -CH₂), 30.61 (*p*-Cym-CH), 23.16 (*p*-Cym-CH-CH₃), 21.87 (*p*-Cym-CH-CH₃), 18.46 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{BrCl}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (51,20/51,01), H (4,61/4,51), N (4,42/4,45); MS (ESI): m/z 1231.02 [$\text{M}+\text{M}-\text{Cl}+2\text{H}$]⁺, 599.02 [$\text{M}-\text{Cl}+2\text{H}$]⁺, 349.03 [$\text{M}-2\text{Cl}-p\text{-Cym}+\text{H}$]⁺, 428.94 [$\text{M}-2\text{Cl}-p\text{-Cym}+\text{H}$]⁺.

(1,3-Dimesityl-1*H*-imidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3i**)

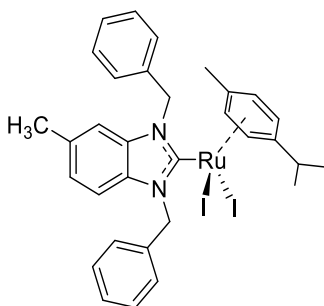
Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dimesityl-1*H*-imidazoliumchlorid (70.0 mg, 0.21 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 21 Tage (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 16.3 mg

(0.03 mmol, 13.0 %), dunkelbraunes-schwarzes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.16 (d, J = 1.5 Hz, Im-H4/H5, 1H), 7.14 (d, J = 1.5 Hz, Im-H4/H5, 1H), 6.99 (s, Mes-1+2-H3+H5, 4H), 6.91 – 6.89 (m, *p*-Cym-H2-H6, 4H), 2.44 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 2.35 (d, J = 0.9 Hz, Mes-1+2-C4-CH₃, 6H), 2.19 (s, *p*-Cym-CH, 1H), 2.07 (t, J = 0.7 Hz, Mes1+2-C2+C6-CH₃, 12H), 1.72 (t, J = 0.7 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); Elementaranalyse $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (60,98/60,52), H (6,27/6,35) N (4,59/4,18).

(1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-dibromido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3b_{Br}**)

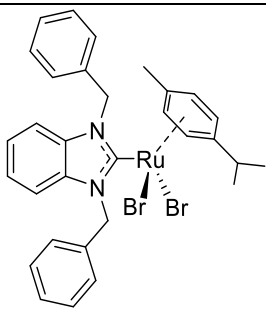
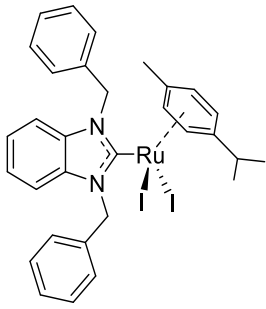
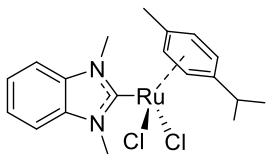
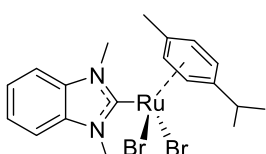
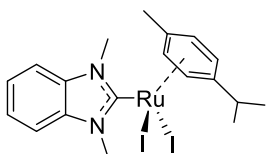
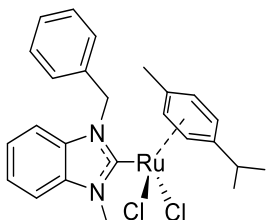


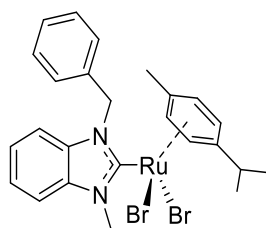
Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumbromid (89.1 mg, 0.23 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 47.5 mg (0.07 mmol, 29.6 %), dunkelrotes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.35 (m, Bn¹/Bn²-H3-H5, 4H), 7.31 – 7.28 (m, Bn¹/Bn²-H3-H5, 2H), 7.14 – 7.11 (m, Bn¹/Bn²-H2+H6, 4H), 6.90 – 6.85 (m, Belm-H6+H7, 2H), 6.82 (dd, $^4J_{\text{H,H}}$ = 1.4 Hz, $^5J_{\text{H,H}}$ = 0.7 Hz, Belm-H4, 1H), 6.56 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.9 Hz, Bn²-CH₂, 1H), 6.45 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.9 Hz, Bn¹-CH₂, 1H), 5.95 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.9 Hz, Bn¹-CH₂, 1H), 5.86 (d, $^2J_{\text{H,H}}$ = 16.9 Hz, Bn²-CH₂, 1H), 5.38 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.00 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.5 Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 2.99 (hept, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 1H), 2.29 (s, Belm-CH₃, 3H), 1.89 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.19 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 189.61 (Belm-C2_{quart.}), 137.51 (Bn²-C1_{quart.}), 137.39 (Bn¹-C1_{quart.}), 135.95 (Belm-C7a_{quart.}), 133.80 (Belm-C3a_{quart.}), 133.27 (Belm-C5_{quart.}), 128.89 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 128.86 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 128.80 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 127.44 (Bn¹/Bn²-C3-C5), 126.20 (Bn¹/Bn²-C2+C6), 126.03 (Bn¹/Bn²-C2+C6), 124.42 (Belm-C6), 111.58 (Belm-C4), 111.36 (Belm-C7), 109.48 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 97.62 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.96 (*p*-Cym-C3+C5), 85.79 (*p*-Cym-C3+C5), 83.55 (*p*-Cym-C2+C6), 54.59 (Bn¹-CH₂), 54.18 (Bn²-CH₂), 30.80 (*p*-Cym-CH), 22.63 (*p*-Cym-CH-CH₃), 22.42 (*p*-Cym-CH-CH₃), 21.41 (Belm-CH₃), 18.75 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (54,32/54,18), H (4,84/4,78) N (3,96/4,12); MS (ESI): m/z 803.40 [$\text{M-Br}+\text{M-2Br-}p\text{-Cym-Ru}$]⁺, 629.09 [M-Br]⁺, 549.18 [M-2Br]⁺, 428.94 [$\text{M-2Br-}p\text{-Cym}$]⁺.

(1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-diiodido-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II) (**3b**)

Synthese nach Vorschrift **3**, Ausgangssubstanz: 1,3-Dibenzyl-5-methyl-1*H*-benzimidazoliumiodid (121.9 mg, 0.28 mmol), Reaktionszeit: 12 h / 48 h (Metallierung / Transmetallierung), Ausbeute: 60.1 mg (0.07 mmol, 27.1 %), dunkelrotes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.37 – 7.28 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H3-H5}$, 6H), 7.12 – 7.08 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H2+H6}$, 4H), 6.85 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, Belm-H6, 1H), 6.82 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^5J_{\text{H,H}} = 0.7$ Hz, Belm-H7, 1H), 6.77 (dt, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, $^5J_{\text{H,H}} = 0.7$ Hz, Belm-H4, 1H), 6.50 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.0$ Hz, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 6.40 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 16.7$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 6.07 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 16.7$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.97 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 17.0$ Hz, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 1H), 5.48 (d, $J = 5.8$ Hz, *p*-Cym-H3+H5, 2H), 5.08 (d, $J = 21.2$ Hz, *p*-Cym-H2+H6, 2H), 3.27 (hept, $J = 6.9$ Hz, *p*-Cym-CH, 1H), 2.28 (s, Belm-CH₃, 3H), 1.96 (s, *p*-Cym-CH₃, 3H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, *p*-Cym-CH-CH₃, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 188.74 (Belm-C2_{quart.}), 137.13 ($\text{Bn}^2\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 137.03 ($\text{Bn}^1\text{-C1}_{\text{quart.}}$), 135.90 (Belm-C7a_{quart.}), 133.77 (Belm-C3a_{quart.}), 133.24 (Belm-C5_{quart.}), 128.81 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 128.75 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 127.48 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C3-C5}$), 126.35 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 126.17 ($\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-C2+C6}$), 124.36 (Belm-C6), 111.74 (Belm-C4), 111.50 (Belm-C7), 110.68 (*p*-Cym-C4_{quart.}), 98.52 (*p*-Cym-C1_{quart.}), 85.93 (*p*-Cym-C3+C5), 84.05 (*p*-Cym-C2+C6), 57.55 ($\text{Bn}^1\text{-CH}_2$), 57.17 ($\text{Bn}^2\text{-CH}_2$), 31.60 (*p*-Cym-CH), 22.92 (*p*-Cym-CH-CH₃), 22.63 (*p*-Cym-CH-CH₃), 21.39 (Belm-CH₃), 19.29 (*p*-Cym-CH₃); Elementaranalyse $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{N}_2\text{Ru}$ (berechnet/gefunden [%]): C (47,95/47,69), H (4,28/4,40) N (3,50/3,25); MS (ESI): m/z 1477.07 $[\text{M-I+M}]^+$, 675.08 $[\text{M-I+H}]^+$, 413.05 $[\text{M-2I-}p\text{-Cym-Ru}]^+$.

Folgende Substanzen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Christian Hartinger an der University of Auckland, Science Centre 302, 23 Symonds Street, Auckland 1010, in Neuseeland synthetisiert und an der TU Braunschweig biologisch evaluiert. [151]

Struktur	Abkürzung	Name
	3a_{Br}	(1,3-Dibenzyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-dibromido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II)
	3a_I	(1,3-Dibenzyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-diiodido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II)
	3a_{Cl}-Me	(1,3-Dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II), nach [126]
	3a_{Br}-Me	(1,3-Dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-dibromido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II)
	3a_I-Me	(1,3-Dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-diiodido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II)
	3a_{Cl}-MeBn	(1-Methyl-3-benzyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylidene)-dichlorido-(η^6 - <i>p</i> -cymol)-ruthenium(II)

**3aBr-MeBn**

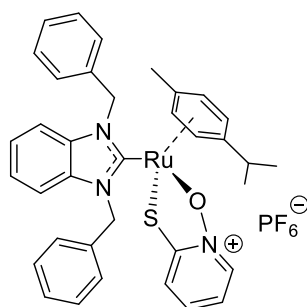
(1-Methyl-3-benzyl-1H-benzimidazol-2-ylidene)-
dibromido-(η^6 -p-cymol)-ruthenium(II)

Tab. 25: Synthetisierte Substanzen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartinger der University of Auckland.

8.4.5 Ruthenium(II)-NHC-Pyrithion-Komplexe

Folgende Substanzen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Iztok Turel und seinen Mitarbeitern Jerneja Kladnik und Simon Preložnik von der Faculty of Chemistry and Chemical Technology - University of Ljubljana, Večna pot 113, 1000 Ljubljana, Slowenien synthetisiert. Die Syntheseentwicklung erfolgte hierbei an der TU Braunschweig, die Optimierung und analytische Auswertung von MS-Spektren und Elementaranalyse an der FKKT, Ljubljana, weshalb diese im Folgenden nicht mit aufgeführt werden. Die Auswertung von NMR-Spektren und biologische Testung wurde wiederum an der TU Braunschweig durchgeführt.

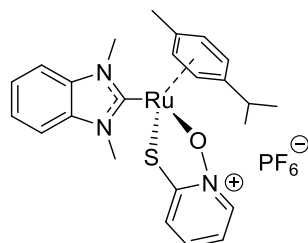
(1,3-Dibenzyl-1H-benzimidazol-2-ylidene)-2-mercaptopyridinium-N-oxid-(η^6 -p-cymol)-ruthenium(II)-hexafluorophosphat (3aPth-Bn)



Synthese nach Vorschrift 6, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ = 7.38 – 7.30 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H2-H6}$, 3H), 7.21 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$, $^5J_{\text{H,H}} = 0.6$ Hz, Pth-H3/H6, 1H), 7.17 – 7.05 (m, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H2-H6}$, 5H + Belm-H4-H7, 3H), 7.03 – 6.99 (m, Belm-H4-H7, 1H), 6.96 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, Pth-H4/H5, 1H), 6.72 (s, $\text{Bn}^1/\text{Bn}^2\text{-H2-H6}$, 2H), 6.70 – 6.69 (m, Pth-H3-H6, 1H), 6.40 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, Pth-H4/H5, 1H), 6.31 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.81 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, $\text{Bn}^1\text{-CH}_2$, 1H), 5.73 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, $p\text{-Cym-H2}$, 1H), 5.68 (m, $\text{Bn}^2\text{-CH}_2$, 2H), 5.59 – 5.56 (m, $p\text{-Cym-H3}$, 1H), 5.51 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, $p\text{-Cym-H5}$, 1H), 4.95 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, $p\text{-Cym-H6}$, 1H), 2.74 (hept, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $p\text{-Cym-CH}$, 1H), 2.08 (s, $p\text{-Cym-CH}_3$, 3H), 1.19 (d,

$^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 3H), 1.04 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 3H), $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 189.90$ (Belm-C2), 157.64 (Pth-C2_{quart.}), 137.09 (Pth-C3-C6), 136.96 (Bn¹-C1_{quart.}), 136.00 (Bn²-C1_{quart.}), 135.19 (Belm-C3a/C7a_{quart.}), 134.86 (Belm-C3a/C7a_{quart.}), 129.48 (Pth-C3-C6), 129.03 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.85 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 128.06 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 126.86 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 126.07 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 125.73 (Pth-C3-C6), 125.08 (Bn¹/Bn²-C2-C6), 123.77 (Belm-C4-C7), 117.80 (Pth-C3-C6), 112.38 ($p\text{-Cym-C4}_{\text{quart.}}$), 111.82 (Belm-C4-C7), 111.74 (Belm-C4-C7), 104.82 ($p\text{-Cym-C1}_{\text{quart.}}$), 90.79 ($p\text{-Cym-C3}$), 85.78 ($p\text{-Cym-C2}$), 84.86 ($p\text{-Cym-C5}$), 83.41 ($p\text{-Cym-C6}$), 52.84 (Bn²-CH₂), 51.51 (Bn¹-CH₂), 30.82 ($p\text{-Cym-CH}$), 23.40 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 21.12 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 18.40 ($p\text{-Cym-CH}_3$).

(1,3-Dimethyl-1*H*-benzimidazol-2-ylidene)-2-mercaptopyridinium-*N*-oxid-(η^6 -*p*-cymol)-ruthenium(II)-hexafluorophosphat (3aPth-Me)



Synthese nach Vorschrift 6, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 8.07 - 8.04$ (m, Pth-H3-H6, 1H), 7.43 – 7.34 (m, Belm-H4-H7, 2H), 7.33 – 7.27 (m, Belm-H4-H7, 2H), 7.12 (m, Pth-H3-H6, 1H), 7.02 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3 \text{ Hz}$, Pth-H4/H5, 1H), 6.81 – 6.73 (m, Pth-H3-H6, 1H), 5.75 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-H2-H6}$, 1H), 5.69 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 1.4 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-H2-H6}$, 1H), 5.65 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-H2-H6}$, 1H), 5.21 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-H2-H6}$, 1H), 4.13 (s, Belm-Me1/2, 3H), 3.88 (s, Belm-Me1/2, 3H), 2.80 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-CH}$, 1H), 2.04 (s, $p\text{-Cym-CH}_3$, 3H), 1.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 3H), 1.11 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $p\text{-Cym-CH-CH}_3$, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) $\delta = 188.01$ (Belm-C2), 158.60 (Pth-C2_{quart.}), 136.97 (Pth-C3-C6), 135.36 (Belm-C3a/C7a_{quart.}), 135.12 (Belm-C3a/C7a_{quart.}), 129.95 (Pth-C3-C6), 126.69 (Pth-C3-C6), 123.63 (Belm-C4-C7), 123.54 (Belm-C4-C7), 118.41 (Pth-C3-C6), 113.36 ($p\text{-Cym-C4}_{\text{quart.}}$), 110.19 (Belm-C4-C7), 110.15 (Belm-C4-C7), 103.70 ($p\text{-Cym-C1}_{\text{quart.}}$), 89.03 ($p\text{-Cym-C2-C6}$), 85.72 ($p\text{-Cym-C2-C6}$), 85.34 ($p\text{-Cym-C2-C6}$), 82.73 ($p\text{-Cym-C2-C6}$), 35.68 (Belm-Me1/2), 34.29 (Belm-Me1/2), 30.96 ($p\text{-Cym-CH}$), 23.19 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 21.29 ($p\text{-Cym-CH-CH}_3$), 18.60 ($p\text{-Cym-CH}_3$).

8.5. Kristallographische Tabelle

Die Kristallstrukturanalyse wurde von Prof. Dr. Peter Jones des Instituts für anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Substanz	3g
Summenformel	C ₂₇ H ₃₀ Cl ₂ N ₂ Ru
Molekulargewicht (g/mol)	554.50
Temperatur (K)	100(2)
Wellenlänge (Å)	1.54184
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P2 ₁ /c
a(Å)	12.16802(10)
b (Å)	16.91411(13)
c (Å)	12.14443(11)
Volumen (Å ³)	2445.03(4)
Z	4
Absorptionskoeffizient (mm ⁻¹)	7.325
F(000)	1136
Kristalldimensionen (mm ³)	0.10 x 0.07 x 0.06
Thetabereich	3.713 - 77.491°
Gemessene Reflexe	102178
Unabhängige Reflexe	5145 (R _{int} = 0.0331)
Vollständigkeit zu θ	99.7 % (θ = 75.000°)
Absorptionskorrektur	Semi-empirisch
Daten / Restraints / Parameter	5145 / 0 / 292
GooF zu F ²	1.112
R1 ($I > 2\sigma(I_0)$)	0.0256
wR2 (alle Reflexe)	0.0703
Restelektronendichte (e.Å ⁻³) min / max	0.598 / -0.731
Strukturname	maundi

Tab. 26: Kristallographische Tabelle des Ruthenium(II)-NHC-Komplexes **3g**.

8.6. Molekulare Modellierung

Die Computersimulationen wurden von Dr. Lutz Preu des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig mit dem Programm Gaussian 98W (Version 5.4 Rev A.9) durchgeführt. Die Struktur wurde mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) berechnet. Verwendet wurde das Austausch-Korrelations-Funktional B3LYP mit dem LANL2DZ - Basissatz. [229]

8.7 Allgemeine Zellkultur

8.7.1 Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien wurden von der DSMZ als Kryokultur bezogen. Zur Kultivierung der Zellen werden diese im Wasserbad aufgetaut. Anschließend erfolgt die Zugabe von vorgewärmten entsprechenden Zellkulturmedium. Die Suspension wird zentrifugiert und das entstandene Zellpellet durch Zugabe von frischem Medium in Zellflaschen überführt und inkubiert. Wenn die Zellen angewachsen sind, werden sie inkubiert bis eine Konfluenz von 80 % erreicht ist. Währenddessen wird in regelmäßigen Abständen das Zellmedium erneuert. Anschließend können die Zellen in Aliquots gesplittet werden. Diese werden in flüssigem Stickstoff bei unter -150°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellen, die der Passage und für Versuche dienen, werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Folgende Zelllinien wurden für die biologische Evaluierung dieser Arbeit verwendet:

HT-29

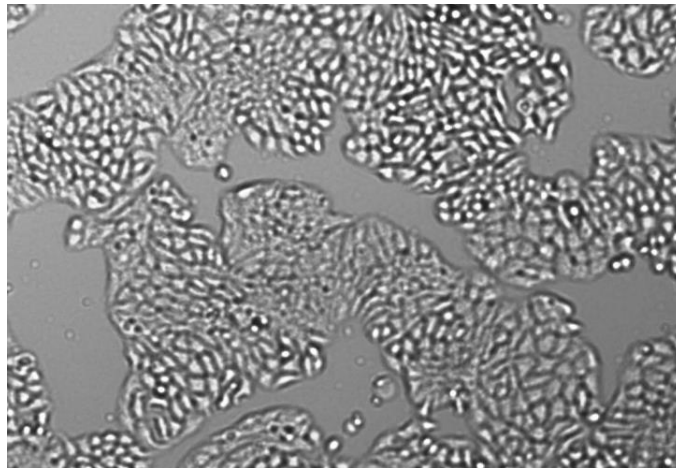


Abb. 89: Mikroskopaufnahmen (96-fache Vergrößerung) von HT-29 Zellen aufgenommen mit Juli™Br .

Es handelt sich bei dieser Zelllinie um humane kolorektale Adenokarzinomzellen, die adhärentes Wachstum zeigen. Sie wurden erstmals von Fogh und Trempe 1975 aus einem Primärtumor einer 44-jährigen Kaukasierin isoliert. [230] Die Zelllinie wird mit DMEM-Medium kultiviert.

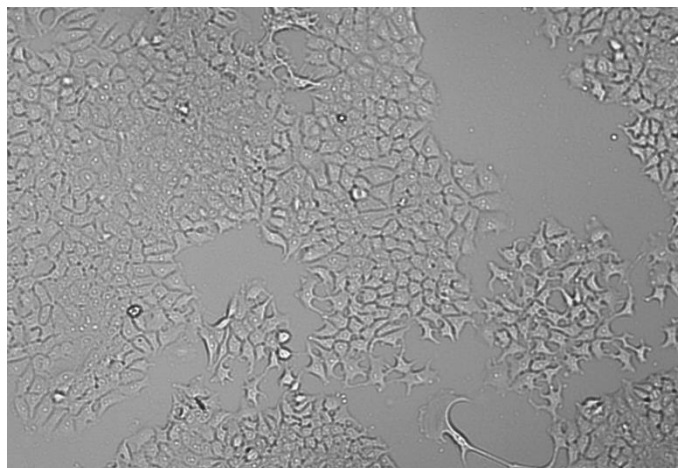
MCF-7

Abb. 90: Mikroskopaufnahmen (96-fache Vergrößerung) von MCF-7 Zellen aufgenommen mit Juli™Br.

Die humane Brustadenokarzinomzellen wurden aus dem Brustgewebe einer 69-jährigen Kaukasierin entnommen. [231] Sie wachsen adhären in Monolayerschichten und sind estradiolabhängig. Die Zelllinie wird mit DMEM-Medium kultiviert.

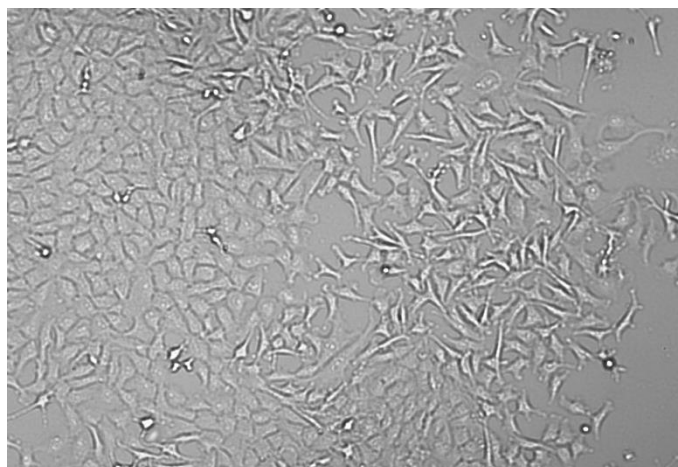
MDA-MB-231

Abb. 91: Mikroskopaufnahmen (96-fache Vergrößerung) von MDA-MB-231 Zellen aufgenommen mit Juli™Br.

Die humane Brustadenokarzinomzelllinie wurde erstmals aus dem Brustgewebe einer 51-jährigen Kaukasierin isoliert. [232] Die Zellen zeichnen sich durch adhärenes Wachstum in Monolayerschichten aus. Im Vergleich zu MCF-7 ist diese Zelllinie nicht estradiolabhängig. Die Zelllinie wird mit DMEM-Medium kultiviert.

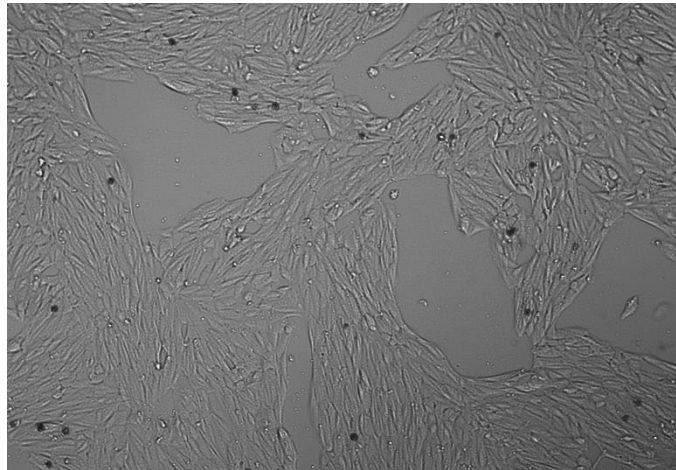
RC-124

Abb. 92: Mikroskopaufnahmen (96-fache Vergrößerung) von RC-124 Zellen aufgenommen mit Juli™Br.

Die humane Nieren-Primärzelllinie wurde einem an Nierenkarzinom erkrankten 63-jährigen Kaukasier aus einem nicht tumorösen Gewebe entnommen. [233] Auch bei dieser Zelllinie liegt ein adhärentes Wachstum in Monolayerschichten vor. Die Zellen werden auf einer Gelatine-Schicht kultiviert und benötigen zum Wachsen das nährstoffreichere McCoy Medium.

8.7.2 Passage

Bevor die Zellzahl zu hoch wird und die Zellen anfangen abzusterben, müssen sie in eine neue Flasche überführt werden. Dieser Vorgang wird Passage (oder Splitting) genannt. Diese wird, je nach Konfluenz der Zellen, einmal wöchentlich durchgeführt. Dazu wird das alte Zellmedium entfernt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden 2 ml Trypsinlösung hinzugesetzt und die Lösung durch Schwenken der Zellflasche gründlich auf dem Zellrasen verteilt. Die Lösung wird abgesaugt und die Flaschen für ca. 2 min im Brutschrank inkubiert. Eine neue Zellflasche wird mit 10 ml Medium befüllt. Die alten Zellflaschen werden nach der Inkubationszeit aus dem Brutschrank entnommen, und die Zellen mit 10 ml frischen Medium vom Boden der Flasche abgelöst. Bei Zellen, die noch am Flaschenboden haften, kann ein Zellschaber zum Ablösen verwendet werden. Mithilfe einer Pipette werden die Zellen vereinzelt. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wird in der Flasche mit neuem Medium verteilt und diese bis zur nächsten Passage im Brutschrank inkubiert. Aliquots können auch zur Vorbereitung von Zellflaschen für Zellaufnahmestudien (Uptake-Studien) und Zellplatten für den Zellviabilitätstest (Zytotox) entnommen werden (siehe Abb. 93).

Für RC-124 Zellen werden leere Zellflaschen mit 10 ml steriler Gelatinelösung behandelt, diese für 1h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 10 ml steriler PBS-Lösung gewaschen, bevor neues Medium in die Flaschen überführt wird.

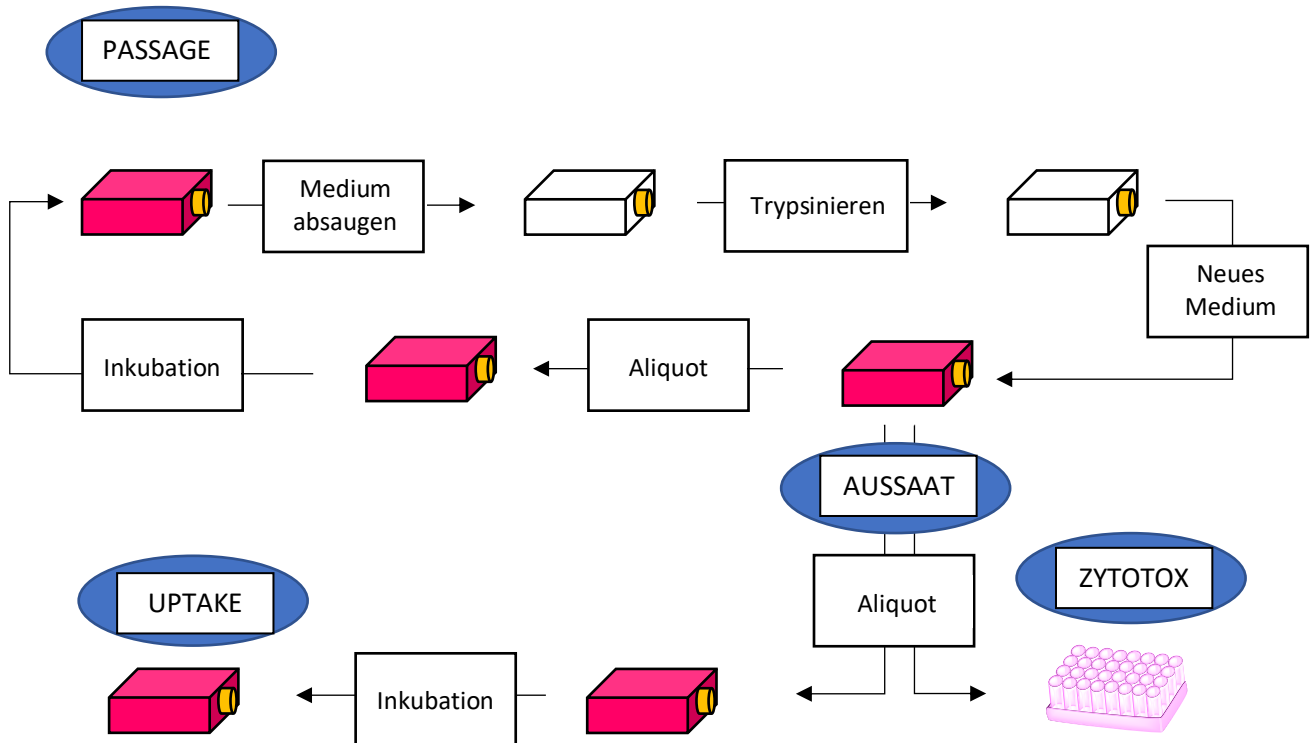


Abb. 93 wöchentliche Handhabung der Zellkultur: Zellpassage, Vorbereitung des Zelluptakes und des Zytotoxizitätstests.

8.7.3 Aussaat

Den Passage-Zellflaschen können Aliquots entnommen werden, die der Aussaat für Zellplatten (zur Durchführung des Antiproliferationsassays) und Zellflaschen (für Zellaufnahmestudien) dienen. Dafür muss zunächst die Zellzahl in den Aliquots bestimmt werden. Hierzu werden 10 μL Zellsuspension der Vorwoche in eine Zählkammer (C-Chip) pipettiert und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Je nach Anzahl der Zellen und Aussaat der Vorwoche kann das ideale Volumen zur Aussaat von neuen Zellen in Zellflaschen oder auf Zellplatten bestimmt werden. Für die Zellflaschen wird ein errechnetes Aliquotvolumen pro Zellflasche in 10 mL Medium vermischt und bis zur Verwendung im Brutschrank inkubiert. Für die Zellplatten wird die Zellsuspension mit Medium vermischt und jeweils 100 μL dieser Lösung pro Loch auf die 96-Lochplatte pipettiert und diese anschließend bis zur Verwendung inkubiert.

8.8 Zellviabilitätstest

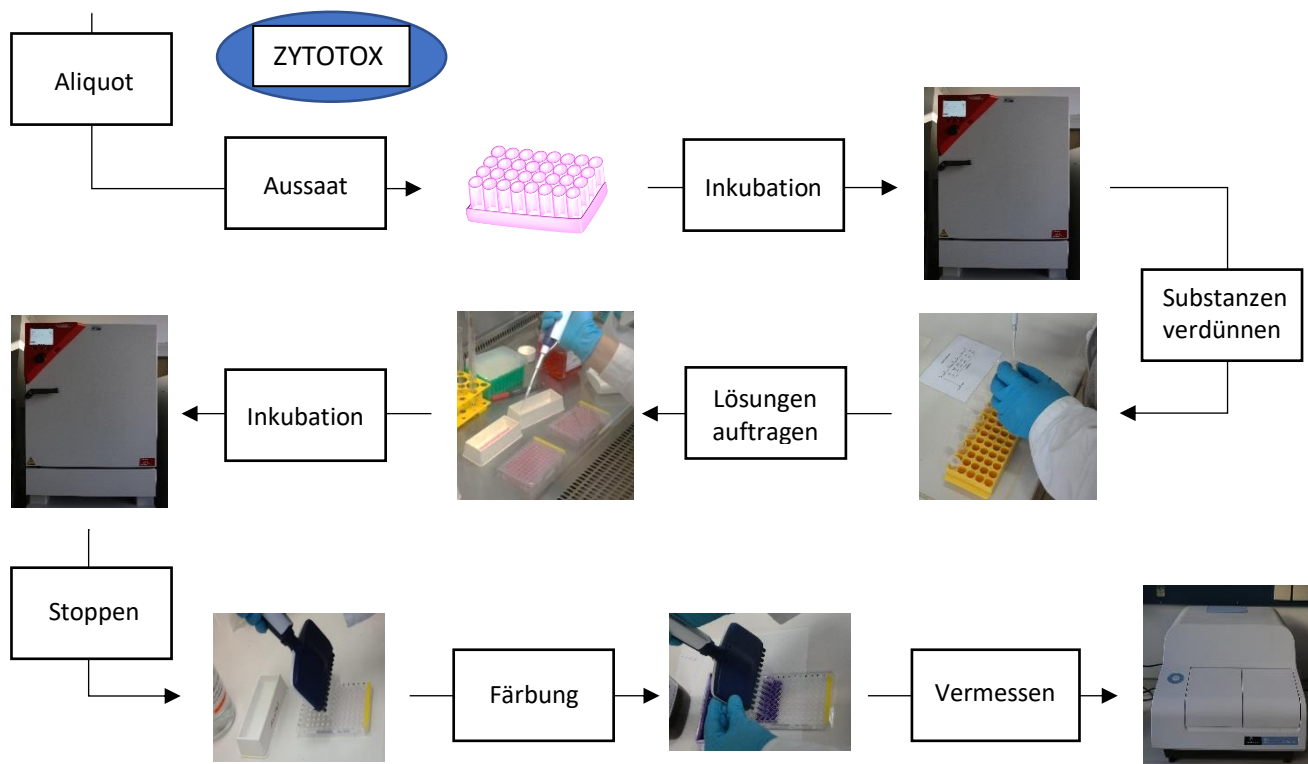


Abb. 94: Schematische Darstellung der Durchführung des Antiproliferations-tests.

8.8.1 Durchführung

Für die Herstellung der Stammlösungen werden die Substanzen 1000-fach höher als die zu bestimmende Endkonzentration in DMF gelöst. Aus den Stammlösungen werden weitere Verdünnungen in DMF hergestellt, wie in dem Pipettierschema (siehe Tab. 27) beispielhaft gezeigt wird.

Jeweils 3 μL der jeweiligen Lösung werden zu 3 ml Zellkulturmedium gegeben und gut durchmischt, wodurch eine 1:1000 Verdünnung erreicht wird. Das alte Medium auf den Zellplatten wird abgesaugt und durch jeweils 200 μL pro Loch durch die Medium-Substanz-Mischung ersetzt.

c (mM)	50	20	10	4	1	0,2
µL	10	10	10	10	10	10
(mM Stammlösung)	(100)	(100)	(20)	(20)	(4)	(1)
+ µL DMF	10	40	10	40	30	40

Tab. 27: Beispielverdünnung einer Substanzlösung für den Antiproliferationstest.

Die Belegung der Platte wird wie folgt durchgeführt:

Reihe	Löcher 1-6	Löcher 7-12
A	Kontrolle (DMF)	Substanz 1 - 0,2 µM
B	Substanz 1 - 1 µM	Substanz 1 - 4 µM
C	Substanz 1 - 10 µM	Substanz 1 - 20 µM
D	Substanz 1 - 50 µM	Substanz 1 - 100 µM
E	Kontrolle (DMF)	Substanz 2 - 0,2 µM
F	Substanz 2 - 1 µM	Substanz 2 - 4 µM
G	Substanz 2 - 10 µM	Substanz 2 - 20 µM
H	Substanz 2 - 50 µM	Substanz 2 - 100 µM

Tab. 28: Plattenbelegung einer 96-Well-Platte beim Antiproliferationstests.

Die jeweilige Lösung wird sechsfach aufgetragen. Begonnen wird mit der geringsten und abgeschlossen mit der höchsten Substanzkonzentration. Die Kontrolle enthält 1 µL DMF in 1 ml Medium. Danach wird die Platte im Brutschrank inkubiert. Zeitgleich lässt man eine t_0 -Platte inkubieren, die während der Durchführung des Antiproliferationstests abgestoppt wird (siehe Kapitel 8.8.2). Anhand dieser Platte lässt sich die Wachstumszunahme der Zellzahl ab Substanzzugabe ermitteln, welche in die Berechnung des IC_{50} -Wertes einbezogen wird.

8.8.2 Abstoppen des Zellwachstums

Nach einer Inkubationszeit von 72 h (HT-29 Zellen), bzw. 96 h (MCF-7, MDA-MB-231, RC-124 Zellen) wird das Zellkulturmedium von den 96-Lochplatten entfernt. 100 µL Glutaraldehydlösung werden zugesetzt: Diese reagiert mit den Aminosäuren, wodurch die Zellen am Plattenboden fixiert werden. Nach 25-minütiger Einwirkungszeit wird die Lösung abgeschüttelt und 180 µL PBS-Lösung hinzugegeben. Diese wird erneut entfernt oder die Platten bis zum nächsten Schritt - dem Färben - im Kühlschrank gelagert.

8.8.3 Färben der Zellplatten

Nachdem die PBS-Lösung abgesaugt wurde, werden die Zellplatten mit 100 µL Kristallviolettlösung versetzt und diese 30 min einwirken gelassen. Anschließend wird die Lösung abgeschüttelt und die Platten zweimal mit Wasser gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Platten werden weitere 15 min mit Wasser befüllt stehen gelassen. Durch Abklopfen auf Papiertüchern wird das Wasser anschließend entfernt. Danach werden 180 µL Ethanol (70 %) zugesetzt, wodurch der von den Zellen aufgenommene Farbstoff aus den Zellen herausgelöst wird und die Platten 2 - 4 Stunden bei leichtem Schütteln stehen gelassen. Die Platten werden bei 590 nm im Mikroplattenreader vermessen.

8.8.4 Berechnung

Berechnet werden die Mittelwerte der sechsfachen Bestimmung einer Substanzkonzentration, wovon anschließend die Mittelwerte der Absorptionen der t_0 -Platte subtrahiert werden. Diese werden in Korrelation mit den Werten der Kontrolle gesetzt, welche auch um die Absorptionen der t_0 -Platte subtrahiert wurden, wodurch sich der T/corr-Wert ergibt:

$$\frac{T}{corr} = 100 * \frac{(S - t_0)}{(K - t_0)}$$

S: Mittelwert der Absorptionen einer Substanzkonzentration

t_0 : Mittelwert der Absorptionen der t_0 -Platte (Durchschnittswert von 96 Wells)

K: Mittelwert der Absorptionen der Kontrolle (DMF in Medium)

Dieser Wert stellt den Anteil des Zellwachstums, bzw. der Zellzahl dar, welche indirekt über die Absorptionen bestimmt wurde. Dabei wurde die Kontrolle als 100 % angesetzt.

Die Berechnung des IC_{50} -Wertes erfolgt durch graphische Darstellung aller T/corr Werte einer Substanz bei unterschiedlichen Konzentrationen im Programms Origin und sigmoidalen Fit der Funktion Hill1. Der IC_{50} -Wert kann bei 50 % des T/corr-Wertes bestimmt werden.

$$\frac{T}{corr} = 50 \% = IC_{50}$$

8.8.5 Transferrin vermittelter Antiproliferationstest an MCF-7 Zellen

Dieser abgewandelte Antiproliferationstest wird wie der vorher beschriebene Test vorbereitet. Es wird zusätzlich eine 5 mM Apotransferrinlösung in DMEM-Medium hergestellt. Von der zu untersuchenden Substanz wird eine gewünschte Verdünnungsreihe in DMF erstellt, die 1000-fach höher konzentriert ist. Anschließend werden 3 µL Substanzlösung zu 3 ml Medium (FCS-frei oder FCS-haltig) gegeben und diese mit 3 µL, bzw. 15 µL Apotransferrinlösung versetzt. Dieses behandelte Medium wird auf die Zellplatten gegeben. Die Durchführung und Weiterbehandlung der Zellplatten läuft analog zum regulären Zellviabilitätstest.

8.9 Life-Cell-Imaging

MCF-7 Zellen werden in einer 75 cm³ Zellflasche mit 3 mL DMEM-Medium inkubiert, bis eine Konfluenz von ca. 20 % erreicht ist. Von der zu untersuchenden Substanz wird eine Stammlösung in DMF hergestellt. Das Medium in der Zellflasche wird abgesaugt, mit 3 mL PBS gespült und anschließend 3 mL frisches Medium mit 3 µL der Stammlösung gemischt, wodurch eine 1:1000 Verdünnung hergestellt wird. Die jetzt vorhandene Konzentration sollte ungefähr dem IC₅₀-Wert der Substanz entsprechen. Als Kontrolle wird eine weitere Flasche, wie oben beschrieben, behandelt. Anstelle der Substanzlösung werden 3 µL DMF hinzugegeben.

Die Flaschen werden für 96h im Brutschrank unter dem Mikroskop Juli™Br inkubiert. Der Bildausschnitt ist so gewählt, dass zu Beginn größere und kleinere Zellverbände sichtbar sind. Während der Inkubationszeit fertigt das Gerät alle 30 min Fotos an und misst die Konfluenz des Zellrasens. Anhand der Fotos können letztendlich Aussagen über die Änderung der Zellmorphologie unter Substanzzugabe getroffen werden. Die Konfluenzmessungen lassen sich im Anschluss graphisch darstellen (Zeit vs. Zellkonfluenz in Prozent) und geben Informationen über das Zellwachstum unter Substanzbehandlung im Vergleich zur Kontrolle.

8.10 Apoptoseuntersuchungen

Die Apoptoseuntersuchungen mittels verschiedener Versuchsreihen wurden von Nicola Wilke der Forschergruppe „Experimentelle Onkologie“ von Dr. Dr. Aram Prokop des Kinderkrankenhauses Köln, Amsterdamer Straße 59, 50735 Köln, durchgeführt.

8.10.1 Apoptoseinduktion in verschiedenen Zelllinien

Die Messung beruht auf einer modifizierten Zell-Zyklus-Analyse, welche die DNA-Fragmentierung auf Einzelzellebene detektiert, nachdem der programmierte Zelltod eingeleitet wurde. Hierzu werden Nalm-6 Zellen (humane, leukämische B-Vorläufer-Leukämie Zellen), die resistenten Varianten NVCR (Resistenz gegen Vincristin), Ndauno (Resistenz gegen Daunorubicin), Mako (Resistenz gegen Cytarabin), Naku (Resistenz gegen Prednisolon), BJAB mock Zellen (Burkitt-like Lymphomzellen), die resistenten Varianten Bibo (Resistenz gegen Vincristin) und 7-CCA (Resistenz gegen Doxorubicin), sowie humane Leukozyten und humane Melanomzellen verwendet. Die Zellen werden mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen / mL ausgesät und mit verschiedenen Substanzkonzentrationen behandelt. Nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C werden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, anschließend mit PBS-Puffer bei 4°C gewaschen und mit einer Formaldehyd-Lösung in PBS (2%, v/v) für 30 min auf Eis gekühlt und fixiert. Das Zellpellet wird in Ethanol/PBS (2:1, v/v) für 15 min inkubiert, pelletiert und in PBS resuspendiert, welches 40 µg / mL RNase enthält. Die RNase wird für 30 min bei 37°C verdaut, die Zellen erneut pelletiert und letztendlich einer 50 µg / mL Propidiumiodid enthaltenden PBS-Lösung ausgesetzt.

Die DNA-Fragmentierung wird mittels Durchflusszytometrie der hypodiploiden DNA, d.h. DNA mit einem vollständigen und unvollständigen haploiden Chromosomensatz, quantifiziert. Die gesammelten Daten werden mittels FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg), welche mit der Software CELL Quest ausgestattet ist, analysiert und ausgewertet. Die Enddaten werden angegeben in Hypoploidie (SubG1) in Prozent, welche die Anzahl der apoptotischen Zellen darstellt.

8.10.2 Messung der mitochondrialen Permeabilität mittels JC-1 Färbung

Die getestete Substanz wird in unterschiedlichen Konzentrationen in Nalm-6 Zellen für 48 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 3000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Zellen werden mit JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanineiodid) angefärbt. Anschließend werden sie mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen / mL in 500 µL Phenolrot-freiem RPMI 1640 ohne Supplemente resuspendiert und 2,5 µg / mL JC-1 hinzugefügt. Die Zellen werden für 30 min bei 37°C unter permanentem Schütteln inkubiert. Zellen ohne Farbstoffzugabe dienen als Kontrolle. Die Zellen werden durch Zentrifugieren bei 4000 rpm für 5min erhalten, danach mit PBS-Puffer gewaschen und in 200 µL PBS-Lösung resuspendiert. Die Auswertung erfolgt erneut Durchflusszytometrie und FACScan.

8.10.3 Bestimmung der LDH-Freisetzung

Nalm-6-Zellen werden unter Substanzbehandlung für 48 h inkubiert. Die Suspension wird bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. 20 µL des Überstandes werden in 80 µL PBS-Puffer verdünnt und 100 µL des Detektionskits (Cytotoxicity Detection Kit, Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany) werden zugesetzt. Die zeitabhängige Bildung des Reaktionsproduktes wird photometrisch bei 490 nm bestimmt. Die maximale LDH-Freisetzung, welche als 100 % gesetzt wird, wird durch Zelllyse unter Zugabe von Triton-X-100-Lösung (0,1 %), durchgeführt.

8.10.4 Zellproliferation

Nalm-6-Zellen werden mit einer Dichte von 10^5 Zellen / mL werden mit der getesteten Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Anschließend werden 100 µL der Zellen zu 10 mL CASYton (gebrauchsfertige salinische Lösung) gelöst und mittels CASY® Cellcounter und Analyser bestimmt. Zellen ohne Substanzbehandlung werden als 0 % Wachstumsinhibition gesetzt.

8.11 Inhibition der Säugetier-Thioredoxinreduktase

Der Versuch wird in Anlehnung an die bereits etablierte Methode von Ott et al. durchgeführt und beruht auf der photometrischen Bestimmung von TNB, welches durch enzymatische Spaltung von DTNB entsteht (siehe Kapitel 4.5). [196]

Für die Messung wird die Thioredoxinreduktase der Ratte bei Sigma käuflich erworben und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Verwendung wird sie mit Reinstwasser auf die gewünschte Konzentration von 1-3 U / mL eingestellt. Um die richtige Enzymkonzentration für die Testungen zu definieren, wird zunächst die Aktivität des Enzyms bestimmt. Hierzu werden verschiedene Verdünnungen des Enzyms als Positivkontrolle (s. unteres Pipettierschema, Tab. 29) auf die Platte aufgetragen, über 75 min inkubiert und vermessen. Die Absorptionen sollten einen linearen Trend folgen. Die kleinste mögliche Aktivität wird für den Test ausgewählt, um so wenig Enzym wie möglich verwenden zu müssen.

Für die Stammlösungen werden die Substanzen in DMF gelöst, sodass eine Konzentration 200fach höher als die Endkonzentration erreicht wird. 10 µL der Stammlösungen werden anschließend mit

990 μL Kaliumphosphatpuffer verdünnt (Substanzlösung). Als Vergleichslösung werden 10 μL DMF mit 990 μL Puffer verdünnt (Vergleichslösung).

Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes werden Verdünnungsreihen der Stammlösungen hergestellt (siehe Tab. 29).

c_{End} (μM)	50	40	30	20	10	5
μL	100	45	40	40	40	40
(c_{End} Stammlösung)		(50)	(40)	(40)	(20)	(10)
+ μL DMF	x	25	15	40	40	40

Tab. 29: Verdünnungsschema für die Stammlösungen zur Bestimmung der IC_{50} -Werte im TrxR-Inhibitionstest. Die erste Zeile c_{End} beschreibt die Endkonzentration nach Verdünnung mit Kaliumphosphatpuffer.

Für 1 mL Reaktionsmix werden 500 μL Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0, 100 mM), 80 μL EDTA-Lösung, 20 μL BSA-Lösung (0,2 %), 100 μL NADPH-Lösung (20 mM) und 300 μL dest. Wasser gemischt. Die Lösung wird bei 37°C zusammen auf der Zellplatte über 75 min inkubiert.

Für die Versuchsdurchführung werden die Lösungen nach folgendem Schema (siehe Tab. 30 Tab. 30) auf eine 96-Lochplatte pipettiert:

	Enzymlösung	Substanzlösung	Puffer	Vergleichslösung
Positivkontrolle	25 μL	-	-	25 μL
Negativkontrolle	-	25 μL	25 μL	-
Substanz	25 μL	25 μL	-	-
Blank	-	-	25 μL	25 μL

Tab. 30: Pipettierschema für den Thioedoxinreduktase-Inhibitionstest.

Die Negativkontrolle dient hierbei zur Überprüfung von Eigenabsorptionen der getesteten Substanzen. Die Blindlösung (Blank) wird zur Messung der Untergrundabsorption benötigt und wird von den Messwerten subtrahiert. Die Platte wird anschließend mit dem Reaktionsmix bei 37°C für 75 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden zuerst in jedes Well 225 μL des Reaktionsmixes pipettiert und danach zügig 25 μL einer 20 mM ethanolischen DTNB-Lösung. Die Platten werden im Mikroplattenreader bei 405 nm vermessen.

Die Plattenbelegung ist in Abb. 95 exemplarisch gezeigt. In dem dargestellten Versuch wurden sechs verschiedene Substanzen bei 10 μM getestet. Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Gelbfärbung in der Reihe C, eine schwächere Gelbfärbung zeigt eine stärkere Inhibition des Enzyms (C3 und C6, blaue Markierung).

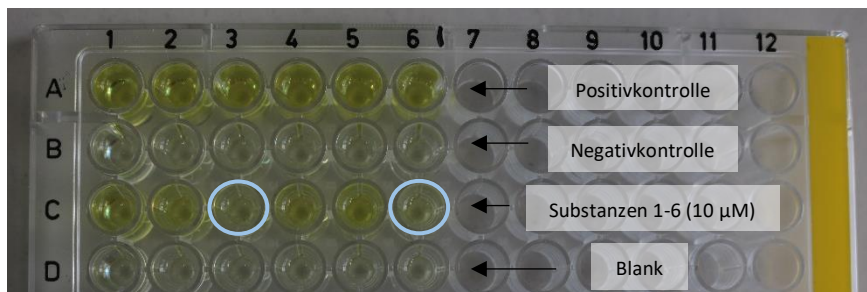


Abb. 95: Exemplarische Plattenbelegung für den TrxR-Inhibitionstest bei verwendeten Substanzkonzentrationen von 10 μM . Deutlich sichtbar ist die gelbe Färbung nach erfolgreicher Umsetzung von DTNB durch das Enzym.

Zur Auswertung wird zuerst die Steigung der Blank Absorptionen von der Steigung der Absorptionen der Substanzen und der Positivkontrolle subtrahiert. Die Absorptionen der Positivkontrolle sollten einem linearen Trend folgen und ein Bestimmtheitsmaß von $> 0,99$ aufweisen.

Zur Berechnung wird die Steigung der Absorptionen der Testsubstanzen durch die Steigung der Absorptionen der Positivkontrolle dividiert und mit 100 multipliziert. Bei einer fest eingesetzten Substanzkonzentration ergibt sich so die Restaktivität des Enzyms im Vergleich zur Positivkontrolle (reines Enzym) in Prozent. Die Subtraktion von 100 ergibt die Enzyminhibition in Prozent.

$$\frac{\text{Steigung Absorptionen Testsubstanzen}}{\text{Steigung Absorptionen Positivkontrolle}} * 100 = \text{Restaktivität [\%]}$$

$$100 - \text{Restaktivität [\%]} = \text{Enzyminhibition [\%]}$$

Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes, werden die Restaktivitäten in Form der Absorptionen den unterschiedlichen Konzentrationen gegenübergestellt und mithilfe des Programms Origin graphisch in der sigmoidalen Boltzmannfunktion dargestellt. Die korrespondierende Konzentration bei 50 % entspricht dem IC_{50} -Wert. Die Endergebnisse ergeben sich aus dem Mittelwert einer dreifachen Durchführung des Versuchs.

8.12 Zellaufnahmestudien (Uptake)

MCF-7 Zellen werden in Zellflaschen inkubiert, bis eine Konfluenz von 70-80 % erreicht ist. Von den zu untersuchenden Substanzen wird eine Stammlösung in DMF hergestellt, die eine 1000-fach höhere Konzentration als die gewünschte Testkonzentration aufweist.

Das alte Medium in den Zellflaschen wird abgesaugt und der Zellrasen mit 10 mL PBS gewaschen. 10 mL frisches Medium werden mit 10 μ L Substanzlösung gemischt, um die gewünschte Endkonzentration zu erzielen. Diese Mischung wird in die Zellflaschen überführt und die Flaschen über einen vorgegebenen Zeitraum bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde für bestimmte Versuche mit FCS versetzt (Zellaufnahmestudien mit / ohne FCS).

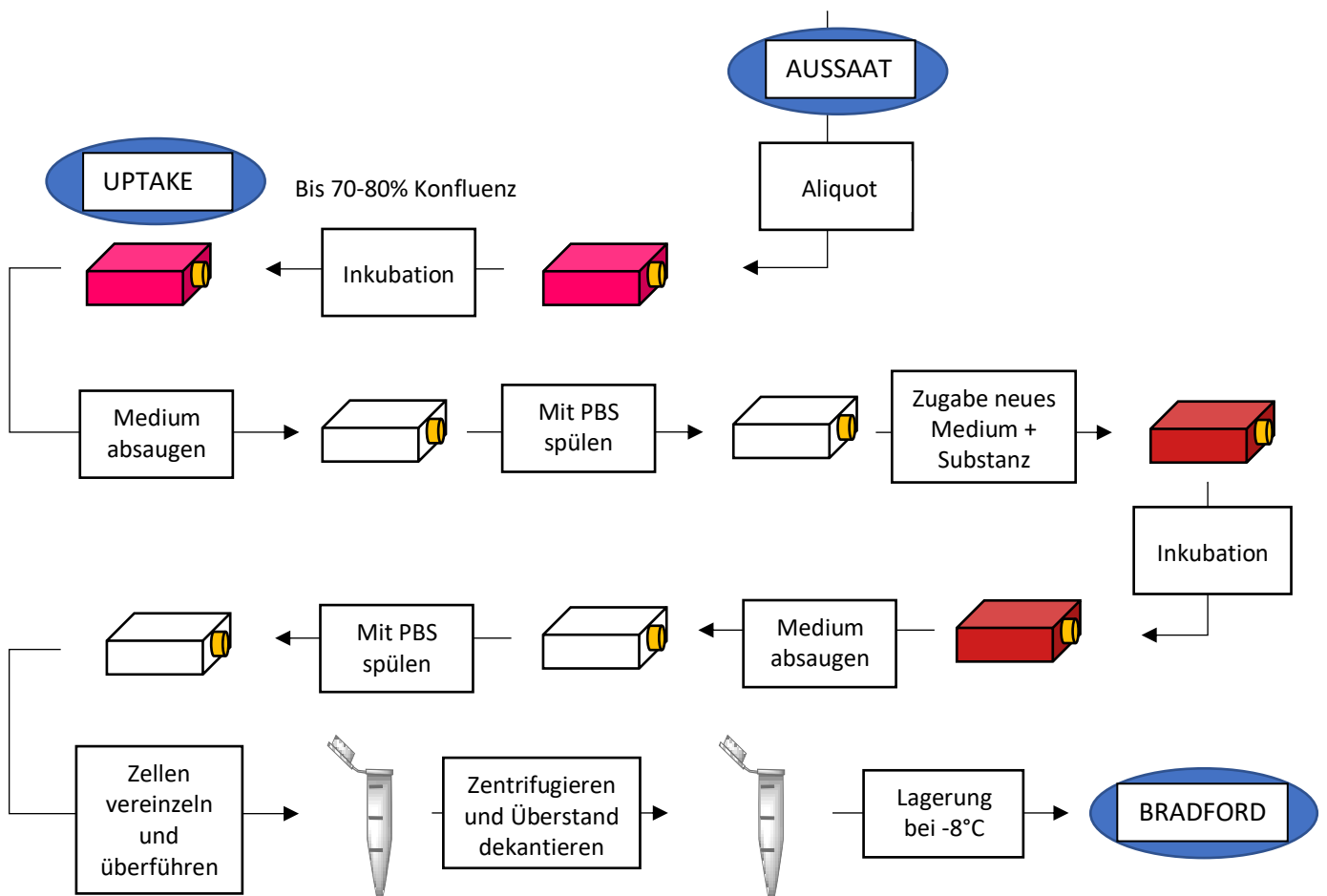


Abb. 96: Schematische Übersicht der Durchführung der Zellaufnahmestudien.

Nach einer Inkubationszeit von 1, 4, 8 und 24 h wird das Medium erneut abgesaugt und der Zellrasen mit 10 mL PBS gewaschen. Nach dem Absaugen dieser Lösung werden 10 mL PBS-Lösung hinzugegeben, die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellflasche gelöst und

anschließend mit einer Pipette vereinzelt. Die Lösung wird in ein Zentrifugentube überführt und im Anschluss bei 3500 rpm (1166 g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das erhaltene Zellpellet bis zur weiteren Messung bei -20°C gelagert.

Zur Vermessung der Proben werden für die Kalibrierung unbehandelte Zellen der gleichen Zelllinie benötigt. Diese werden wie Substanzflaschen aufbereitet, nur dass die Inkubationszeit entfällt. Auch diese Zellpellets werden im Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

8.12.1 Transferrin-vermittelte Zellaufnahmestudien

Die Vorbereitung der Zellflaschen läuft analog zu der normalen Zellaufnahmestudien. Neben der Substanz wird dem Medium zusätzlich Apotransferrin (ATF) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Dafür wird eine 5 mM Apotransferrin-Lösung in serumfreiem DMEM-Medium hergestellt und anschließend 10 µL (äquimolare Lösung) oder 50 µL (fünffache molare Lösung) zu 10 mL Medium gegeben und mit 10 µL einer 5 mM Substanzlösung vermischt. Die genauen Versuchsbedingungen sind der Tab. 31 zu entnehmen.

Ein Versuch erfordert den Zusatz von Eisen(III)-chlorid. Dafür wird eine 5 mM Eisen(III)-chlorid-Lösung in serumfreiem Medium hergestellt und 3 µL dieser Lösung mit 10 mL serumfreiem Medium, 10 µL Apotransferrinlösung und 10 µL Substanzlösung vermischt. Diese Mischung wird in zellfreie Zellflaschen überführt und für 2 h im Brutschrank gelagert. Erst nach der Vorinkubation wird das behandelte Medium auf die mit Zellen angezüchtete Zellflasche gegeben und über den gewünschten Zeitraum inkubiert.

Nr.	Bedingung	Substanz-Lösung [µL]	serumfreies Medium [mL]	Apotransferrin-Lösung [µL]	FeCl ₃ -Lösung [µL]	Vor-inkubation
1	-	10	10	-	-	-
2	+ ATF	10	10	10	-	-
3	+ATF +Fe	10	10	10	3	2h
4	+ATF 1:1 m.l.	10	10	10	-	2h
5	+ATF 1:1 o.l.	10	10	10	-	-
6	+ATF 1:5	10	10	50	-	-

Tab. 31: getestete Versuchsbedingungen für die Transferrin-vermittelten Zellaufnahmestudien unter Ausschluss von FCS, m.l.: mit Vorinkubation, o.l.: ohne Vorinkubation.

8.12.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die quantitative Gehaltsbestimmung der Proteine in den Proben erfolgt nach der photometrischen Methode nach Bradford. [234] Dafür werden die Zellpellets bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 300 μL destilliertem Wasser versetzt und für 30 min im Ultraschallbad lysiert. Um nachfolgend eine Absorption im linearen Bereich der Kalibriergeraden zu erhalten, werden 5 μL Probelösung mit 45 μL dest. Wasser verdünnt. Für die Matrixproben (unbehandelte Zellen) werden 5 μL Matrix werden mit 95 μL dest. Wasser versetzt.

Für die Kalibrierung wird eine 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ BSA-Stammlösung hergestellt, die nach folgender Tabelle verdünnt wird:

BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	μL (Verdünnung)	μL RW
1000	-	1000
500	100 (von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	100
400	400 (von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	600
300	300 (von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	700
200	100 (von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	400
100	200 (von 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	600
75	150 (von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	50
50	100 (von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	100
25	50 (von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	150
10	40 (von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	360
0	0	200

Tab. 32: Verdünnung der Kalibrierlösung für die Proteinbestimmung nach Bradford.

Jeweils 20 μL der Probe-, bzw. der Kalibrierlösungen werden in eine 96-Lochplatte pipettiert. Da eine Doppeltbestimmung durchgeführt wird, wird jede Lösung zweifach auf die Platte aufgetragen. Ein Beispiel einer Plattenbelegung ist Abb. 97 zu entnehmen. Anschließend werden zu jeder Probe 200 μL Bradford-Reagenz pipettiert und die Lösungen gut durchmischt. Mit einer Pipettenspitze werden eventuell entstandene Luftblasen zerstochen.

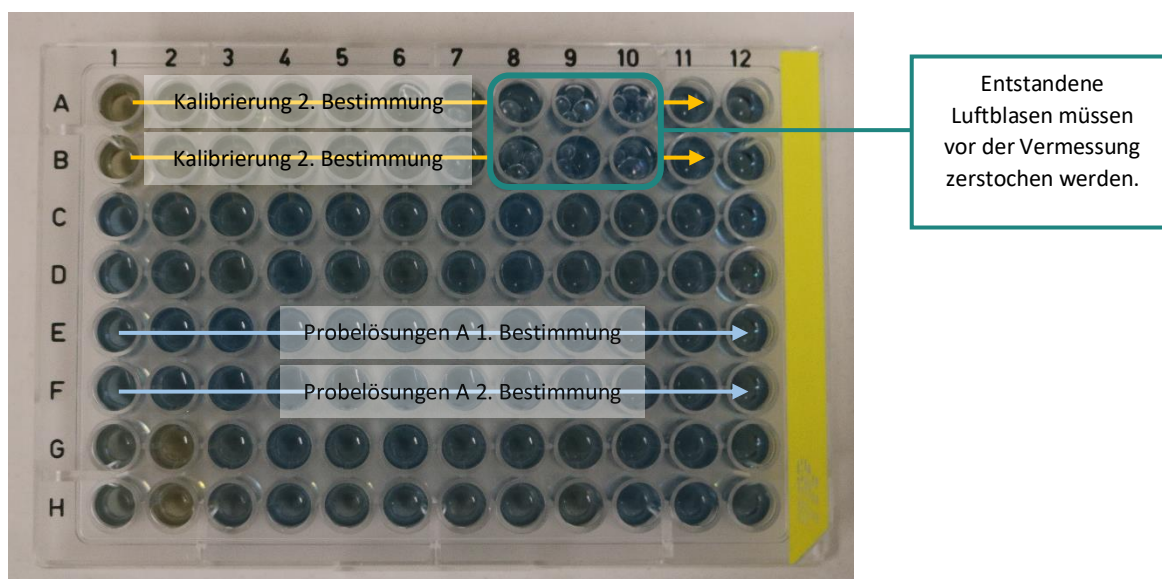


Abb. 97: Beispielhafte Plattenbelegung für den Bradford-Assay. Das Foto wurde nach Zugabe des Bradford-Reagenzes angefertigt.

Nach 25-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wird bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption im Mikroplattenreader gemessen. Für einen linearen Trend sollten die Absorptionen der Lösungen Werte zwischen 0,2 - 0,7 zeigen. Zur Auswertung wird anhand der Absorptionen der Kalibrierung der Proteingehalt der Proben ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergerade sollte hierbei über 0,99 liegen.

8.12.3 Bestimmung des Metallgehalts der Uptakeproben mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Der Metallgehalt wird mittels HR-CS-AAS und der Graphitrohrfentechnik nach einer bereits etablierten Methode vermessen. [210] Dazu werden die Uptakeproben und Matrixpellets mit Reinstwasser auf eine Proteinkonzentration von 1,5 mg / mL in einem Vial verdünnt, sodass ein Gesamtvolumen von 200 μ L vorliegt.

Für die Kalibrierung wird eine Stammlösung aus der zu untersuchenden Substanz in DMF hergestellt und nach folgendem Schema (siehe Tab. 33) verdünnt:

c	5 mM	50 μM	40 μM	30 μM	25 μM	20 μM	15 μM	10 μM	7,5 μM	5 μM
μL		10	350	150	100	100	100	100	100	100
(Stammlösung)		(5m M)	(50 μM)	(40 μM)	(50 μM)	(40 μM)	(30 μM)	(20 μM)	(15 μM)	(10 μM)
+ μL RW		990	80	50	100	100	100	100	100	100
20 μL Kalibrierlösung + 180 μL Matrixlösung										
Endkonz. (μM)		5	4	3	2,5	2	1,5	1	0,75	0,5

Tab. 33: Verdünnungsschema der Kalibrierlösungen für die AAS-Messung.

Die Proben werden „matrix-matched“ vermessen. Anhand dieses Schemas werden die Kalibrierlösungen mittels der Matrixlösung ebenfalls auf einen Proteingehalt auf 1,5 mg / mL verdünnt. Zur Vermessung werden zu jeder Probe 10 μL Salpetersäure (13 %) und 10 μL Triton-Lösung (1 %) als Modifier gegeben.

Schritte	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasspülung
Trocknung	80	6	15	max
Trocknung	90	10	25	Max
Trocknung	120	15	30	Max
Trocknung	500	50	50	Max
Pyrolyse	900	200	20	max
Gasadaption	900	0	5	stop
Atomisierung	2400	1500	4	stop
Ausheizen	2600	1000	6	max

Tab. 34: Temperaturprogramm der HR-CS-AAS-Methode zur Bestimmung des Rutheniumgehalts.

Die Proben werden mit einem Volumen von 50 μL dreimal injiziert und Ruthenium bei einer Wellenlänge von 349,90 nm detektiert (siehe Abb. 98). Die genauen Temperaturschritte sind der Tab. 34 zu entnehmen. Aus den Daten der Kalibrierlösungen wird eine Kalibriergerade erstellt. Das Bestimmtheitsmaß sollte einen Wert von > 0,995 aufzeigen. Der Rutheniumgehalt wird über die

gemessenen Absorptionen der Proben anhand der Kalibriergeraden berechnet und letztendlich auf 1 mg / mL Protein bezogen.

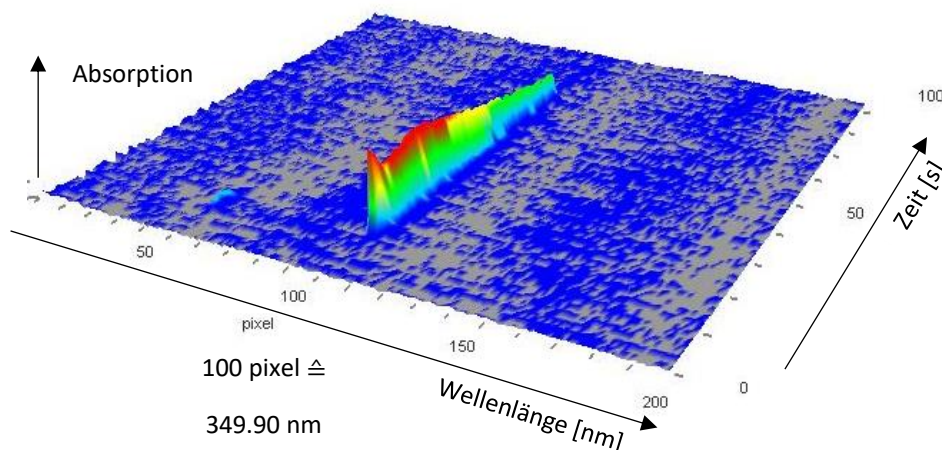


Abb. 98: HR-CS Atomabsorptionsspektrum von einer Ruthenium enthaltenden Probe (Konzentration der Probe: 2 μ M).

8.12.4 Bestimmung des Fluorgehaltes in den Uptakeproben mittels Molekülabsorptionsspektrometrie

Die Vermessung von Fluor in den Proben erfolgt nach einer bereits etablierten Methode über die indirekte Bestimmung von Fluor als Galliummonofluorid. [227,213] Auch hier wurde die Graphitrohrfentechnik verwendet, wobei das Graphitrohr vor Verwendung mit einer 0,05 mm dicken Tantal-Folie (Sigma-Aldrich, Germany) genau ausgekleidet und thermisch vorbehandelt wurde. Vor der Messung ist eine gründliche Reinigung des Graphitrohrfens notwendig. Zur Probenvorbereitung werden 100 μ L Probelösung mit 10 μ L frisch hergestellter, 1%iger Triton-Lösung gemischt. Die Kalibrierlösungen werden analog zu Kapitel 8.12.3 aus einer Stammlösung der jeweilig zu vermessenden Substanz- und Matrixlösung hergestellt. Das Injektionsvolumen beträgt 20 μ L. Zur Vorbehandlung der Tantal-Folie werden 2 μ L einer 5,0 g / L und 5 μ L einer 7,5 g / L Galliumnitratlösung injiziert. Anschließend erfolgt die Injektion der Probe. Das Fluor wird als Galliummonofluorid in einer Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 211,248 nm detektiert (siehe Abb. 99). Zu Beginn der Messung erfolgt die Bestimmung von Fluor in Reinstwasser. Erst wenn gleichbleibende Absorptionen erreicht werden, die den Blindwert der Messung darstellen, kann mit der eigentlichen Vermessung der Proben begonnen werden.

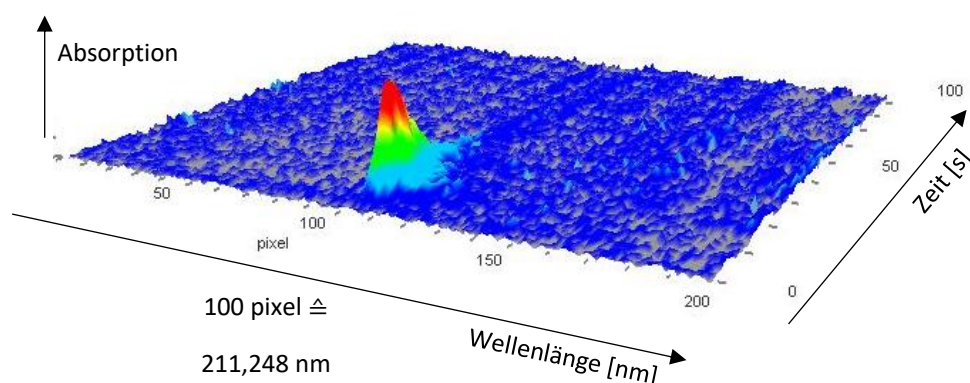


Abb. 99: HR-CS Atomabsorptionsspektrum von Galliummonofluorid, welches aus organisch gebundenem Fluor gebildet wurde. (Konzentration der Probe: 4 μM).

8.13 Proteinbindungsstudien

8.13.1 Durchführung der Proteinbindungsstudien

In den Proteinbindungsstudien wird die Bindung der Rutheniumkomplexe an bovines Serumalbumin (BSA) untersucht. Diese beruhen auf der Ethanol-Präzipitationsmethode nach Ma et al. [217]

Hierbei werden jeweils 400 mg BSA mit 10 mL serumfreien DMEM Medium, d.h. ohne Zusatz weiterer Supplemente, versetzt. Von der zu untersuchenden Substanz wird eine Stammlösung in DMF hergestellt, die eine 1000-fach höhere Konzentration als die gewünschten Testkonzentrationen aufweist. 10 μL Stammlösung werden zu 10 mL BSA-versetztem Medium gegeben, wodurch die gewünschte Endkonzentration erreicht wird. Für die Blindwertlösung werden 10 μL DMF verwendet. Die Lösungen werden über den gewünschten Zeitraum unter permanentem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten (hier: 0, 1, 4 und 8 h) werden 250 μL Probelösung entnommen und direkt mit 500 μL absoluten Ethanol (gelagert bei -25°C) versetzt und die Mischung kurz geschwenkt, wodurch die Proteine ausgefällt werden. Für den Nullpunkt entfällt die Inkubationszeit.

Die Proben werden für jeweils 2 h im Gefrierschrank aufbewahrt und anschließend bei 4800 rpm (1853 g) und 4°C für 10 min zentrifugiert.

250 μL vom Überstand werden entnommen und bis zur weiteren Messung mittels Atomabsorptionsspektroskopie bei -25°C aufbewahrt.

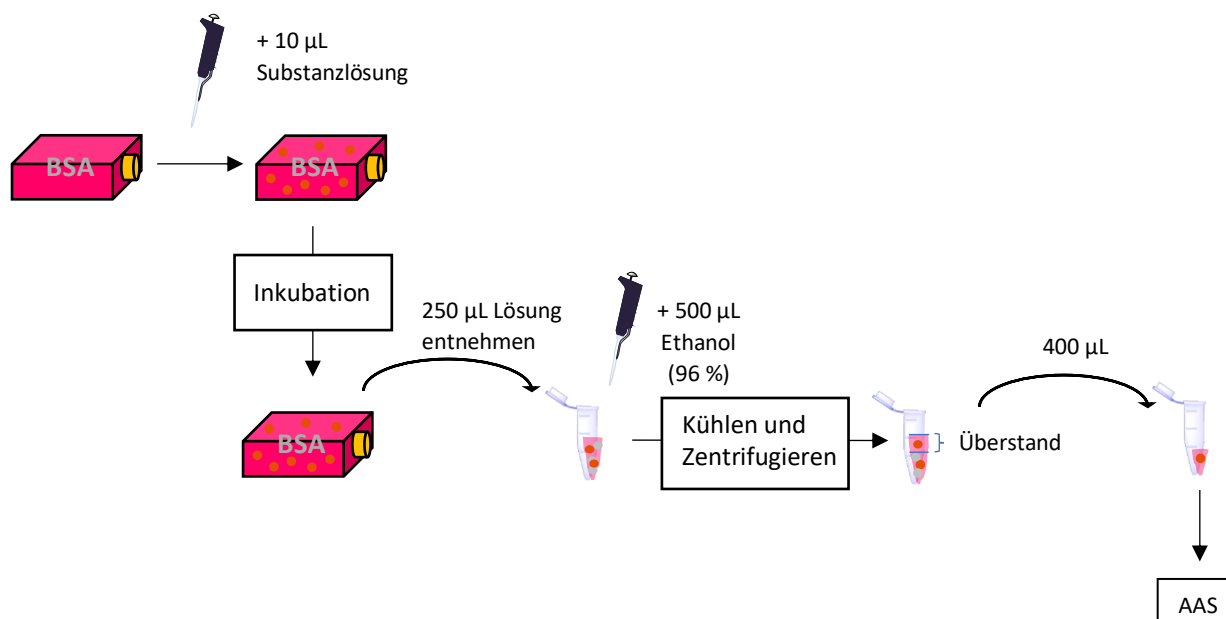


Abb. 100: Schematische Probenzubereitung der Proteinbindungsstudien, graue Punkte: Protein, rote Punkte: Rutheniumkomplex.

8.13.2 Bestimmung des Metallgehalts der Proteinbindungsproben mittels

Atomabsorptionsspektrometrie

Da der Proteingehalt in den Proben bekannt ist, entfällt die Bradford-Bestimmung und anschließende Verdünnung der Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration. Für die Kalibrierung wird analog zu Tab. 33 eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Kalibrierungspunkte setzen sich aus 10 µL Kalibrierlösung und 90 µL Blindwertlösung zusammen. Zur Vermessung der Proben und der Kalibrierung werden zu jedem Vial 10 µL Salpetersäure (13 %) und 10 µL Triton-Lösung (1 %) als Modifier zugegeben. 100 µL Probelösung werden vor jeder Injektion frisch in ein Vial pipettiert, damit Verdampfungseffekte der ethanolischen Lösung und Aufkonzentrierung der Substanzlösung im Vial vermieden werden. Das Injektionsvolumen beträgt 25 µL. Das verwendete Temperaturprogramm der AAS-Messung entspricht der in der Tab. 34 aufgeführten Programm. Die Auswertung läuft analog zur Bestimmung des Metallgehaltes der Zellaufnahmestudien. Die Ergebnisse stellen auch hier die Mittelwerte der Absorptionen der dreifachen Injektion einer Probe dar. Allerdings wird bei dieser Messung der ungebundene Anteil von Metall an Protein bestimmt.

Der gebundene Anteil von dem Rutheniumkomplex an das Protein, lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$PB [\%] = 100 / (c_0 * (c_{ungeb.} - c_0 * 3))$$

PB: Proteinbindung

c_0 : Ausgangskonzentration in μM

$c_{ungeb.}$: ungebundene Rutheniumkomplex-Konzentration in μM

8.14 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC)

Die Versuche wurden von Pascal Prochnow der AG Angewandte Mikrobiologie von Prof. Dr. Julia Bandow, Ruhr Universität Bochum, Universitätsstraße 150, 44780 Bochum durchgeführt.

Für die Versuche wurden die gram-positiven Bakterienstämmen *Bacillus subtilis* 168 DSM 402, *Staphylococcus aureus* DSM 20231, *S.aureus* ATCC 43300, die gram-negativen Bakterienstämmen *Escherichia coli* DSM 30083, *Acinetobacter baumannii* DSM 30007, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 und die Pilzart *Candida albicans* DSM 1386 verwendet.

Die Bakterienstämme werden in Müller-Hinton-Agar kultiviert. Für die *Candida Albicans* Art wird der Sabouraud Dextrose-Agar verwendet.

Von den jeweilig getesteten Substanzen werden 10 mg / mL DMSO-Stammlösungen hergestellt und daraus Verdünnungsreihen von 512 – 0,5 μg / mL erstellt und auf Mikrotiterplatten aufgetragen. Die Substanzlösungen werden mit 200 μL einer Lösung der jeweiligen Bakterienstämme beimpft. Die Bakteriensuspensionen enthalten 10^5 Bakterien / mL, die der Kultur zu einem Zeitpunkt von spät-exponentiellem Wachstum entnommen wurde. Die Platten werden 16 h bei 37°C inkubiert. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) stellt die geringste Substanzkonzentration dar, die sichtbares Bakterienwachstum inhibiert.

8.15 Inhibition der bakteriellen Thioredoxinreduktase

Für die Testung wurde die bakterielle TrxR aus *E.coli* und das Substrat Thioredoxin bei Sigma Aldrich käuflich erworben. Für die Verwendung wird das Enzym TrxR mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 35,5 U / mL, das Substrat Trx auf eine Aktivität von 0,77 U / ml verdünnt.

Die Testsubstanzen werden in DMF gelöst, sodass eine 200-fach höher konzentrierte Stammlösung erhalten wird. Die gewünschte Endkonzentration wird durch Verdünnung von 35 μL Stammlösung mit 965 μL TE-Puffer (Probelösung) erhalten. Als Blindlösung dient DMF in Puffer. Die Messung kann mit

einer fixen Substanzkonzentration durchgeführt werden, um die prozentuale Inhibierung des Enzyms bei dieser Konzentration zu bestimmen. Oder es kann der IC_{50} -Wert ermittelt werden, bei der verschiedene Substanzkonzentrationen getestet werden. Die Vorbereitung hierfür läuft analog zum Säugetier-TrxR Test in Kapitel 8.11. Zudem werden für die Testung 400 μ M NADPH-Lösung und TE-Puffer benötigt. Die Lösungen werden wie folgt auf eine 96-Lochplatte pipettiert:

	NADPH-Lösung	Enzym-lösung	Substanz-lösung	Substrat-lösung	TE-Puffer	Vergleich-lösung
Positivkontrolle	100 μ L	10 μ L	-	10 μ L	10 μ L	20 μ L
Negativkontrolle	100 μ L	-	20 μ L	10 μ L	-	
Substanz	100 μ L	10 μ L	20 μ L	10 μ L	-	-
Blank	100 μ L	-	-	-	20 μ L	20 μ L

Tab. 35: Pipettierschema für den *E.coli* Thioredoxinreduktase-Inhibitionstest.

Im Anschluss wird die Platte über 75 min unter ständigem Schütteln bei 25°C inkubiert. Für den Reaktionsmix werden eine 400 μ M NADPH-Lösung und 10 mM DTNB-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach der Inkubationszeit wird 100 μ L Reaktionsmix zu jedem Loch hinzu pipettiert und die Platte sofort bei 412 nm im Mikroplattenreader vermessen.

Die Auswertung erfolgt analog zur Auswertung der Inhibition der Säugetier-TrxR (Kapitel 8.11), auch hier sollte die Steigung der Absorptionen einen linearen Trend folgen und ein Bestimmtheitsmaß > 0,99 aufzeigen.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Papavramidou, N.; Papavramidis, T.; Demetriou, T., Ancient Greek and Greco-Roman methods in modern surgical treatment of cancer, *Annals of Surgical Oncology* (2010), 17, 665 – 667.
- [2] Osborne, M. P., William Stewart Halsted: his life and contributions to surgery, *The Lancet Oncology* (2007), 8, 256 – 265.
- [3] DeVita, V. T.; Chu, E., A history of cancer chemotherapy, *Cancer Research* (2008), 68, 8643 – 8653.
- [4] Laurent, Q.; Batchelor, L. K.; Dyson, P. J., Applying a Trojan Horse Strategy to Ruthenium Complexes in the Pursuit of Novel Antibacterial Agents, *Organometallics* (2018), 37, 915 – 923.
- [5] Shapiro, S., Speculative strategies for new antibacterials: all roads should not lead to Rome, *The Journal of Antibiotics* (2013), 66, 371 – 386.
- [6] WHO, The top 10 causes of death, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2018), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [7] Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst, Krebsstatistiken, <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php#inhalt2> (2017), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [8] Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebs gesamt, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html (2017), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [9] WHO, Cancer, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2018), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [10] Zaman, S. B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T.; Hossain, N., A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing, *Cureus* (2017), 9, 1 – 9.
- [11] OECD, Stemming the Superbug Tide: Just A Few Dollars More, *OECD Health Policy Studies*, OECD Publishing (2018).
- [12] Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleesschauwer, B.; Cecchini, M.; Ouakrim, D. A.; Oliveira, T. C.; Struelens, M. J.; Suetens, C.; Monnet, D. L.; Burden of AMR Collaborative Group, Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis, *The Lancet Infectious Diseases* (2019), 19, 56 – 66.
- [13] WHO, In the face of slow progress, WHO offers a new tool and sets a target to accelerate action against antimicrobial resistance, <https://www.who.int/news-room/detail/18-06-2019-in-the->

- face-of-slow-progress-who-offers-a-new-tool-and-sets-a-target-to-accelerate-action-against-antimicrobial-resistance (2019), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [14] WHO, AdoptAWaRe Kampagne der WHO, <https://adoptaware.org/> (2019), Zuletzt geprüft am 25.06.2019.
- [15] Die forschenden Pharma-Unternehmen, Innovationsbilanz 2018: Viele Fortschritte durch neue Medikamente, <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/innovationsbilanz-2018-viele-fortschritte-durch-neue-medikamente> (2019), Zuletzt geprüft am 01.07.2019.
- [16] Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M., The essential metals for humans: a brief overview, *Journal of Inorganic Biochemistry* (2019), 195, 120 – 129.
- [17] Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A., Noble metals in medicine: Latest advances, *Coordination Chemistry Reviews* (2015), 284, 329 – 350.
- [18] Rubbiani, R.; Wahrig, B.; Ott, I., Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2014), 19, 961 – 965.
- [19] Williams, K. J., The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine - the first magic bullet, *Journal of the Royal Society of Medicine* (2009), 102, 343 – 348.
- [20] Benedek, T. G., The history of gold therapy for tuberculosis, *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* (2004), 59, 50 – 89.
- [21] Healy, M. L.; Lim, K. K. T.; Travers, R., Jacques Forestier (1890-1978) and gold therapy, *International Journal of Rheumatic Diseases* (2009), 12, 145 – 148.
- [22] Mukherjee, A.; Sadler, P. J., Metals in Medicine: Therapeutic Agents, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (2009), 49, 1 – 47.
- [23] Ott, I.; Gust, R., Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Archiv der Pharmazie* (2007), 340, 117 – 126.
- [24] Sutton, B. M.; McGusty, E.; Walz, D. T.; DiMartino, M. J., Oral gold. Antiarthritic properties of alkylphosphinegold coordination complexes, *Journal of Medicinal Chemistry* (1972), 15, 1095 – 1098.
- [25] Capparelli, E. V.; Bricker-Ford, R.; Rogers, M. J.; McKerrow, J. H.; Reed, S. L., Phase I Clinical Trial Results of Auranofin, a Novel Antiparasitic Agent, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2017), 61, 1 – 8.
- [26] Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W., The Discovery and Development of Cisplatin, *Journal of Chemical Education* (2006), 83, 728 – 734.
- [27] Hoeschele, J. D., Dr Barnett Rosenberg - a Personal Perspective, *Dalton Transactions* (2016), 45, 12966 – 12969.

- [28] Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T., Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature* (1965), 205, 698 – 699.
- [29] Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J., The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs, *Chemical Reviews* (2016), 116, 3436 – 3486.
- [30] Meier-Menches, S. M.; Gerner, C.; Berger, W.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K., Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents - towards clinical development, *Chemical Society Reviews* (2018), 47, 909 – 928.
- [31] Ott, I.; Gust, R., Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika, *Pharmazie in unserer Zeit* (2006), 35, 124 – 133.
- [32] Dilruba, S.; Kalayda, G. V., Platinum-based drugs: past, present and future, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2016), 77, 1103 – 1124.
- [33] Alcindor, T.; Beauger, N., Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy, *Current Oncology* (2011), 18, 18 – 25.
- [34] Galanski, M.; Keppler, B. K., Tumorstemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven, *Pharmazie in unserer Zeit* (2006), 35, 118 – 123.
- [35] Barillo, D. J.; Marx, D. E., Silver in medicine: a brief history BC 335 to present, *Burns* (2014), 40, 3-8.
- [36] Reginster, J.-Y.; Hilgsmann, M.; Bruyere, O., Strontium Ranelate: Long-Term Efficacy against Vertebral, Nonvertebral and Hip Fractures in Patients with Postmenopausal Osteoporosis, *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* (2010), 2, 133 – 143.
- [37] Alda, M., Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics, *Molecular Psychiatry* (2015), 20, 661 – 670.
- [38] Guo, Z.; Sadler, P. J., Metalle in der Medizin, *Angewandte Chemie* (1999), 111, 1610 – 1630.
- [39] Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG), Leitlinie: Diagnostik und Therapie der viszeralen Leishmaniasis (Kala-Azar), https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/042-004l_S1_viszerale_Leishmaniasis_Kalar_Azar_2017-01.pdf (2016), Zuletzt geprüft am 26.06.2019.
- [40] Wikipedia, Paul Ehrlich, <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=188937969> (2019), Zuletzt geprüft am 15.07.2019.
- [41] Wikipedia, Barnett Rosenberg, <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=136370325> (2014), Zuletzt geprüft am 15.07.2019.
- [42] Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N., Organometallic anticancer compounds, *Journal of Medicinal Chemistry* (2011), 54, 3 – 25.

- [43] Roder, C.; Thomson, M. J., Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age, *Drugs in R&D* (2015), 15, 13 – 20.
- [44] Rubbiani, R.; Can, S.; Kitanovic, I.; Alborzinia, H.; Stefanopoulou, M.; Kokoschka, M.; Mönchgesang, S.; Sheldrick, W. S.; Wölfl, S.; Ott, I., Comparative in vitro evaluation of N-heterocyclic carbene gold(I) complexes of the benzimidazolylidene type, *Journal of Medicinal Chemistry* (2011), 54, 8646 – 8657.
- [45] Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K., From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III) (KP1019 or FFC14A), *Journal of Inorganic Biochemistry* (2006), 100, 891 – 904.
- [46] Süss-Fink, G., Arene ruthenium complexes as anticancer agents, *Dalton Transactions* (2010), 39, 1673 – 1688.
- [47] Jaouen, G., *Bioorganometallics, Biomolecules, labeling, medicine*, Wiley-VCH (2006), 1. Auflage.
- [48] Allardyce, C. S.; Dyson, P. J., Metal-based drugs that break the rules, *Dalton Transactions* (2016), 45, 3201 – 3209.
- [49] Bergamo, A.; Masi, A.; Dyson, P. J.; Sava, G., Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound, *International Journal of Oncology* (2008), 33, 1281 – 1289.
- [50] Alessio, E., Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2017), 2017, 1549 – 1560.
- [51] Pluim, D.; van Waardenburg, R. C. A. M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M., Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2004), 54, 71 – 78.
- [52] Fuereder, T.; Berger, W., Metal drugs become targeted, *ESMO open* (2017), 2, 1-3.
- [53] Groessl, M.; Zava, O.; Dyson, P. J., Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin, *Metallomics* (2011), 3, 591 – 599.
- [54] Gransbury, G. K.; Kappen, P.; Glover, C. J.; Hughes, J. N.; Levina, A.; Lay, P. A.; Musgrave, I. F.; Harris, H. H., Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments, *Metallomics* (2016), 8, 762 – 773.
- [55] Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K., NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application, *Chemical Science* (2014), 5, 2925 – 2932.
- [56] Springer Medizin, IT-139: Wirkmechanismus entschlüsselt, *InFo Onkologie* (2018), 21, 40.
- [57] Bergamo, A.; Sava, G., Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases, *Chemical Society Reviews* (2015), 44, 8818 – 8835.

- [58] Berndsen, R. H.; Weiss, A.; Abdul, U. K.; Wong, T. J.; Meraldi, P.; Griffioen, A. W.; Dyson, P. J.; Nowak-Sliwinska, P., Combination of ruthenium(II)-arene complex Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta) (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity, *Scientific Reports* (2017), 7, 1 – 16.
- [59] Hahn, F. E.; Jahnke, M. C., *Heterocyclische Carbene – Synthese und Koordinationschemie, Angewandte Chemie* (2008), 120, 3166 – 3216.
- [60] Dröge, T.; Glorius, F., Das Maß aller Ringe - N-heterocyclische Carbene, *Angewandte Chemie* (2010), 122, 7094 – 7107.
- [61] Arduengo, A. J.; Krafczyk, R., Auf der Suche nach Stabilen Carbenen, *Chemie in unserer Zeit* (1998), 32, 6 – 14.
- [62] Martin, D.; Melaimi, M.; Soleilhavoup, M.; Bertrand, G., A Brief Survey of our Contribution to Stable Carbene Chemistry, *Organometallics* (2011), 30, 5304 – 5313.
- [63] Hahn, F. E., Introduction: Carbene Chemistry, *Chemical Reviews* (2018), 118, 9455 – 9456.
- [64] Arduengo, A. J.; Harlow, R. L.; Kline, M., A stable crystalline carbene, *Journal of the American Chemical Society* (1991), 113, 361 – 363.
- [65] Feroci, M.; Chiarotto, I.; Inesi, A., Advances in the Knowledge of N-Heterocyclic Carbenes Properties. The Backing of the Electrochemical Investigation, *Catalysts* (2016), 6, 178.
- [66] Herrmann, W. A.; Köcher, C., N-Heterocyclic Carbenes, *Angewandte Chemie* (1997), 36, 2162 – 2187.
- [67] Fischer, E. O.; Maasböl, A., On the Existence of a Tungsten Carbonyl Carbene Complex, *Angewandte Chemie* (1964), 3, 580 – 581.
- [68] Taylor, T. E.; Hall, M. B., Theoretical comparison between nucleophilic and electrophilic transition metal carbenes using generalized molecular orbital and configuration interaction methods, *Journal of the American Chemical Society* (1984), 106, 1576 – 1584.
- [69] Schrock, R. R.; Meakin, P., Pentamethyl complexes of niobium and tantalum, *Journal of the American Chemical Society* (1974), 96, 5288 – 5290.
- [70] Patil, S. A.; Patil, R.; Keri, R. S.; Budagumpi, S.; Balakrishna, G. R.; Tacke, M., N-heterocyclic carbene metal complexes as bio-organometallic antimicrobial and anticancer drugs, *Future Medicinal Chemistry* (2015), 7, 1305 – 1333.
- [71] Occhipinti, G.; Jensen, V. R., Nature of the Transition Metal-Carbene Bond in Grubbs Olefin Metathesis Catalysts, *Organometallics* (2011), 30, 3522 – 3529.
- [72] Wanzlick, H.-W.; Schönherr, H.-J., Direkt-Synthese eines Quecksilbersalz-Carben-Komplexes, *Angewandte Chemie* (1968), 80, 154.

- [73] Herrmann, W. A.; Elison, M.; Fischer, J.; Köcher, C.; Artus, G. R. J., Metallkomplexe heterocyclischer Carbene - ein neues Katalysator-Strukturprinzip in der homogenen Katalyse, *Angewandte Chemie* (1995), 107, 2602 – 2605.
- [74] Grubbs, R. H.; Trnka, T. M., Ruthenium-Catalyzed Olefin Metathesis, in: Murahashi, Shun-Ichi, *Ruthenium in organic synthesis*, Wiley-VCH (2005), 153 – 177.
- [75] Trnka, T. M.; Grubbs, R. H., The Development of L 2 X 2 RuCHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story, *Accounts of Chemical Research* (2001), 34, 18 – 29.
- [76] Casey, C. P., 2005 Nobel Prize in Chemistry. Development of the Olefin Metathesis Method in Organic Synthesis, *Journal of Chemical Education* (2006), 83, 192.
- [77] Oehninger, L.; Alborzinia, H.; Ludewig, S.; Baumann, K.; Wölfl, S.; Ott, I., From catalysts to bioactive organometallics: do Grubbs catalysts trigger biological effects?, *ChemMedChem* (2011), 6, 2142 – 2145.
- [78] Coverdale, J.; Laroiya-McCarron, T.; Romero-Canelón, I., Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates?, *Inorganics* (2019), 7, 31.
- [79] Lebeau, A., Platinum Group Elements: Palladium, Iridium, Osmium, Rhodium, and Ruthenium, in: Harbison, R. D.; Bourgeois, M. M.; Johnson, G. T., *Hamilton & Hardy's industrial toxicology*, 33, John Wiley & Sons Inc (2015), 187 – 192.
- [80] Zeng, L.; Gupta, P.; Chen, Y.; Wang, E.; Ji, L.; Chao, H.; Chen, Z.-S., The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials, *Chemical Society Reviews* (2017), 46, 5771 – 5804.
- [81] Dyson, P. J., Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development, *CHIMIA International Journal for Chemistry* (2007), 61, 698 – 703.
- [82] Klavierhocker, <https://www.pianelli.de/klavierhocker-schwarz-rund.html> (2019), Zuletzt geprüft am 30.06.2019.
- [83] Therrien, B., Arene Ruthenium Complexes in Supramolecular Chemistry, in: van Eldik, R.; Puchta, R., *Advances in Inorganic Chemistry, Supramolecular chemistry*, 71, Academic Press, an imprint of Elsevier (2018), 379 – 402.
- [84] Kenny, R. G.; Marmion, C. J., Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?, *Chemical Reviews* (2019), 119, 1058 – 1137.
- [85] Gandhaveeti, R.; Konakanchi, R.; Jyothi, P.; Bhuvanesh, N. S. P.; Anandaram, S., Unusual coordination mode of aroyl/acyl thiourea ligands and their π -arene ruthenium (II) piano-stool complexes: Synthesis, molecular geometry, theoretical studies and biological applications, *Applied Organometallic Chemistry* (2019), 33, 1 – 13.

- [86] Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P. J., Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action, *Journal of Organometallic Chemistry* (2011), 696, 989 – 998.
- [87] Kljun, J.; Bytcek, A. K.; Kandioller, W.; Bartel, C.; Jakupec, M. A.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Turel, I., Physicochemical Studies and Anticancer Potency of Ruthenium η -p-Cymene Complexes Containing Antibacterial Quinolones, *Organometallics* (2011), 30, 2506 – 2512.
- [88] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P., Mutschler Arzneimittelwirkungen, *Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*, WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (2013), 10. Auflage.
- [89] Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* (2011), 144, 646 – 674.
- [90] Weinstein, I. B., Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heal of cancer, *Science* (2002), 297, 63 – 64.
- [91] Chial, H., Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer, <https://www.nature.com/scitable/topicpage/proto-oncogenes-to-oncogenes-to-cancer-883> (2008), Zuletzt geprüft am 30.06.2019.
- [92] Luque-Cabal, M.; García-Teijido, P.; Fernández-Pérez, Y.; Sánchez-Lorenzo, L.; Palacio-Vázquez, I., Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It, *Clinical Medicine Insights. Oncology* (2016), 10, 21 – 30.
- [93] Prokop, A.; Czaplewska, J. A.; Clausen, M.; König, M.; Wild, A.; Thorwirth, R.; Schulze, B.; Babiuch, K.; Pretzel, D.; Schubert, U. S.; Gottschaldt, M., Iridium(III) Complexes of Terpyridine- and Terpyridine-Analogous Ligands Bearing Sugar Residues and Their in vitro Activity, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2016), 2016, 3480 – 3488.
- [94] Kompaktlexikon der Biologie, Zellzyklus, <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/zellzyklus/13060> (2001), Zuletzt geprüft am 01.07.2019.
- [95] Ford, H. L.; Pardee, A. B., The S phase: beginning, middle, and end: a perspective, *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* (1998), 30/31, 1 – 7.
- [96] Rutz, H. P., Cancer therapy meets p53, *The New England Journal of Medicine* (1994), 331, 1314 – 1315.
- [97] Cassidy, P. B.; Edes, K.; Nelson, C. C.; Parsawar, K.; Fitzpatrick, F. A.; Moos, P. J., Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles, *Carcinogenesis* (2006), 27, 2538 – 2549.
- [98] Höffeler, F., Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes, *Biologie in unserer Zeit* (2004), 34, 16 – 23.
- [99] Okada, H.; Mak, T. W., Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells, *Nature Reviews Cancer* (2004), 4, 592 – 603.

- [100] Kroemer, G.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Peter, M. E.; Vaux, D.; Vandenabeele, P.; Zhivotovsky, B.; Blagosklonny, M. V.; Malorni, W.; Knight, R. A.; Piacentini, M.; Nagata, S.; Melino, G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, Cell Death and Differentiation (2005), 12, 1463 – 1467.
- [101] Tonissen, K. F.; Di Trapani, G., Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy, Molecular Nutrition & Food Research (2009), 53, 87 – 103.
- [102] Ouyang, Y.; Peng, Y.; Li, J.; Holmgren, A.; Lu, J., Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems, Metallomics (2018), 10, 218 – 228.
- [103] Melino, G.; Knight, R. A.; Nicotera, P., How many ways to die? How many different models of cell death?, Cell Death and Differentiation (2005), 12, 1457 – 1462.
- [104] Ren, X.; Zou, L.; Zhang, X.; Branco, V.; Wang, J.; Carvalho, C.; Holmgren, A.; Lu, J., Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System, Antioxidants & Redox Signaling (2017), 27, 989 – 1010.
- [105] Conrad, M.; Jakupoglu, C.; Moreno, S. G.; Lippl, S.; Banjac, A.; Schneider, M.; Beck, H.; Hatzopoulos, A. K.; Just, U.; Sinowatz, F.; Schmahl, W.; Chien, K. R.; Wurst, W.; Bornkamm, G. W.; Brielmeier, M., Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function, Molecular and Cellular Biology (2004), 24, 9414 – 9423.
- [106] Lu, J.; Chew, E-H.; Holmgren, A., Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2007), 104, 12288 – 12293.
- [107] Holmgren, A.; Johansson, C.; Berndt, C.; Lönn, M. E.; Hudemann, C.; Lillig, C. H., Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, Biochemical Society Transactions (2005), 33, 1375 – 1377.
- [108] Lennon, B. W.; Williams, C. H.; Ludwig, M. L., Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from Escherichia coli: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor, Protein Science (1999), 8, 2366 – 2379.
- [109] Arnér, E. S.; Holmgren, A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, European Journal of Biochemistry (2000), 267, 6102 – 6109.
- [110] Zhong, L.; Arnér, E. S.; Holmgren, A., Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2000), 97, 5854 – 5859.
- [111] Miranda-Vizueté, A.; Sadek, C. M.; Jiménez, A.; Krause, W. J.; Sutovsky, P.; Oko, R., The mammalian testis-specific thioredoxin system, Antioxidants & Redox Signaling (2004), 6, 25 – 40.

- [112] Lothrop, A. P.; Ruggles, E. L.; Hondal, R. J., No selenium required: reactions catalyzed by mammalian thioredoxin reductase that are independent of a selenocysteine residue, *Biochemistry* (2009), 48, 6213 – 6223.
- [113] Sandalova, T.; Zhong, L.; Lindqvist, Y.; Holmgren, A.; Schneider, G., Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2001), 98, 9533 – 9538.
- [114] Lu, J.; Holmgren, A., Thioredoxin system in cell death progression, *Antioxidants & Redox Signaling* (2012), 17, 1738 – 1747.
- [115] Lu, J.; Vlamis-Gardikas, A.; Kandasamy, K.; Zhao, R.; Gustafsson, T. N.; Engstrand, L.; Hoffner, S.; Engman, L.; Holmgren, A., Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione, *FASEB journal* (2013), 27, 1394 – 1403.
- [116] Conrad, M. E.; Umbreit, J. N., Iron absorption and transport? An update, *American Journal of Hematology* (2000), 64, 287 – 298.
- [117] Drakesmith, H.; Nemeth, E.; Ganz, T., Ironing out Ferroportin, *Cell Metabolism* (2015), 22, 777 – 787.
- [118] Brissot, P.; Loréal, O., Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries, *Journal of Hepatology* (2016), 64, 505 – 515.
- [119] RGD, iron homeostasis pathway, https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW:0000590, Zuletzt geprüft am 10.07.2019.
- [120] Sun, H.; Li, H.; Sadler, P. J., Transferrin as a metal ion mediator, *Chemical Reviews* (1999), 99, 2817 – 2842.
- [121] Jong, G. de; van Dijk, J. P.; van Eijk, H. G., The biology of transferrin, *Clinica Chimica Acta* (1990), 190, 1 – 46.
- [122] Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K., Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology, *Chemical Reviews* (2006), 106, 2224 – 2248.
- [123] Prutki, M.; Poljak-Blazi, M.; Jakopovic, M.; Tomas, D.; Stipancic, I.; Zarkovic, N., Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer, *Cancer Letters* (2006), 238, 188 – 196.
- [124] Daniels, T. R.; Bernabeu, E.; Rodriguez, J. A.; Patel, S.; Kozman, M.; Chiappetta, D. A.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y.; Helguera, G.; Penichet, M. L., The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer, *Biochimica et Biophysica Acta* (2012), 1820, 291 – 317.
- [125] Oehninger, L.; Spreckelmeyer, S.; Holenya, P.; Meier, S. M.; Can, S.; Alborzinia, H.; Schur, J.; Keppler, B. K.; Wolfl, S.; Ott, I., Rhodium(I) N-Heterocyclic Carbene Bioorganometallics as in Vitro

- Antiproliferative Agents with Distinct Effects on Cellular Signaling, *Journal of Medicinal Chemistry* (2015), 58, 9591 – 9600.
- [126] Oehninger, L.; Stefanopoulou, M.; Alborzinia, H.; Schur, J.; Ludewig, S.; Namikawa, K.; Munoz-Castro, A.; Koster, R. W.; Baumann, K.; Wolfl, S.; Sheldrick, W. S.; Ott, I., Evaluation of arene ruthenium(II) N-heterocyclic carbene complexes as organometallics interacting with thiol and selenol containing biomolecules, *Dalton Transactions* (Cambridge, England : 2003) (2013), 42, 1657 – 1666.
- [127] Streciwilk, W.; Terenzi, A.; Misgeld, R.; Frias, C.; Jones, P. G.; Prokop, A.; Keppler, B. K.; Ott, I., Metal NHC Complexes with Naphthalimide Ligands as DNA-Interacting Antiproliferative Agents, *ChemMedChem* (2017), 12, 214 – 225.
- [128] Rubbiani, R.; Kitanovic, I.; Alborzinia, H.; Can, S.; Kitanovic, A.; Onambele, L. A.; Stefanopoulou, M.; Geldmacher, Y.; Sheldrick, W. S.; Wolber, G.; Prokop, A.; Wolfl, S.; Ott, I., Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties, *Journal of Medicinal Chemistry* (2010), 53, 8608 – 8618.
- [129] Schmidt, C.; Karge, B.; Misgeld, R.; Prokop, A.; Franke, R.; Brönstrup, M.; Ott, I., Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects, *Chemistry, A European Journal* (2017), 23, 1869 – 1880.
- [130] Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP, *Dalton Transactions* (2006), 1796 – 1802.
- [131] Matczuk, M.; Prządka, M.; Aleksenko, S. S.; Czarnocki, Z.; Pawlak, K.; Timerbaev, A. R.; Jarosz, M., Metallomics for drug development: a further insight into intracellular activation chemistry of a ruthenium(III)-based anticancer drug gained using a multidimensional analytical approach, *Metallomics* (2014), 6, 147 – 153.
- [132] Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Heath, S. L., [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells, *Chemical Communications* (2001), 1396 – 1397.
- [133] Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J., In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes, *Journal of Medicinal Chemistry* (2005), 48, 4161 – 4171.
- [134] Son, S. U.; Park, K. H.; Lee, Y.-S.; Kim, B. Y.; Choi, C. H.; Lah, M. S.; Jang, Y. H.; Jang, D.-J.; Chung, Y. K., Synthesis of Ru(II) complexes of N-heterocyclic carbenes and their promising photoluminescence properties in water, *Inorganic Chemistry* (2004), 43, 6896 – 6898.

- [135] Pongratz, M.; Schluga, P.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Allmaier, G.; Keppler, B. K., Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (2004), 19, 46 – 51.
- [136] Lu, Y.; Shi, T.; Wang, Y.; Yang, H.; Yan, X.; Luo, X.; Jiang, H.; Zhu, W., Halogen bonding--a novel interaction for rational drug design?, *Journal of Medicinal Chemistry* (2009), 52, 2854 – 2862.
- [137] Lu, Y.; Wang, Y.; Zhu, W., Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: implications for drug discovery and biomolecular design, *Physical Chemistry Chemical Physics* (2010), 12, 4543 – 4551.
- [138] Schmidt, C.; Karge, B.; Misgeld, R.; Prokop, A.; Brönstrup, M.; Ott, I., Biscarbene gold(i) complexes: structure-activity-relationships regarding antibacterial effects, cytotoxicity, TrxR inhibition and cellular bioavailability, *MedChemComm* (2017), 8, 1681 – 1689.
- [139] Morita, T.; Uneyama, C., Genotoxicity assessment of 4-methylimidazole: regulatory perspectives, *Genes and Environment : the official journal of the Japanese Environmental Mutagen Society* (2016), 38, 1 – 4.
- [140] Toxicology and carcinogenesis studies of 4-methylimidazole (Cas No. 822-36-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies), *National Toxicology Program Technical Report Series* (2007), 1 – 274.
- [141] Sigma Aldrich, Sicherheitsdatenblatt 4-Methylimidazol, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=199885&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F199885%3Flang%3Dde> (2012), Zuletzt geprüft am 02.06.2019.
- [142] Scolaro, C.; Hartinger, C. G.; Allardyce, C. S.; Keppler, B. K.; Dyson, P. J., Hydrolysis study of the bifunctional antitumour compound RAPTA-C, Ru(eta⁶-p-cymene)Cl₂(pta), *Journal of Inorganic Biochemistry* (2008), 102, 1743 – 1748.
- [143] Romero-Canelón, I.; Salassa, L.; Sadler, P. J., The contrasting activity of iodo versus chlorido ruthenium and osmium arene azo- and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway, *Journal of Medicinal Chemistry* (2013), 56, 1291 – 1300.
- [144] Chandler, C. J.; Segel, I. H., Mechanism of the antimicrobial action of pyrithione: effects on membrane transport, ATP levels, and protein synthesis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1978), 14, 60 – 68.
- [145] Reeder, N. L.; Kaplan, J.; Xu, J.; Youngquist, R. S.; Wallace, J.; Hu, P.; Juhlin, K. D.; Schwartz, J. R.; Grant, R. A.; Fieno, A.; Nemeth, S.; Reichling, T.; Tiesman, J. P.; Mills, T.; Steinke, M.; Wang, S. L.;

- Saunders, C. W., Zinc pyrithione inhibits yeast growth through copper influx and inactivation of iron-sulfur proteins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011), 55, 5753 – 5760.
- [146] Kljun, J.; Anko, M.; Traven, K.; Sinreih, M.; Pavlič, R.; Peršič, Š.; Ude, Ž.; Codina, E. E.; Stojan, J.; Lanišnik Rižner, T.; Turel, I., Pyrithione-based ruthenium complexes as inhibitors of aldo-keto reductase 1C enzymes and anticancer agents, *Dalton Transactions* (2016), 45, 11791 – 11800.
- [147] Erxleben, A., Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes, *Current Medicinal Chemistry* (2019), 26, 694 – 728.
- [148] Bastos, C.; Booker, M. L.; Celatka, C., A; Clardy, J. C.; Cortese, J.; Patel, V. P.; Skerlj, R.; Wiegand, R. C.; Wirth, D. F., Small molecules inhibitors of plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase (2009).
- [149] Lee, I.; Park, Y. K.; Huh, C.; Lee, H. W., Nucleophilic substitution reaction of benzyl bromide with N, N-Dimethylaniline: Significance of equilibrium cross-interaction constant, *Journal of Physical Organic Chemistry* (1994), 7, 555 – 560.
- [150] Begtrup, M.; Larsen, P.; Edlund, U., Alkylation, Acylation, and Silylation of Azoles, *Acta Chemica Scandinavica* (1990), 44, 1050 – 1057.
- [151] Lam, N. Y. S.; Truong, D.; Burmeister, H.; Babak, M. V.; Holtkamp, H. U.; Movassaghi, S.; Ayine-Tora, D. M.; Zafar, A.; Kubanik, M.; Oehninger, L.; Söhnle, T.; Reynisson, J.; Jamieson, S. M. F.; Gaiddon, C.; Ott, I.; Hartinger, C. G., From Catalysis to Cancer: Toward Structure-Activity Relationships for Benzimidazol-2-ylidene-Derived N-Heterocyclic-Carbene Complexes as Anticancer Agents, *Inorganic Chemistry* (2018), 57, 14427 – 14434.
- [152] Benzylbromid, <https://www.chemie.de/lexikon/Benzylbromid.html>, Zuletzt geprüft am 02.06.2019.
- [153] Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Eine Einführung, Wiley-VCH-Verl. (2006), 4. Auflage.
- [154] Pregosin, P. S., NMR in organometallic chemistry, Wiley-VCH (2012), 1. Auflage.
- [155] Tapu, D.; Dixon, D. A.; Roe, C., ¹³C NMR spectroscopy of "Arduengo-type" carbenes and their derivatives, *Chemical Reviews* (2009), 109, 3385 – 3407.
- [156] Zou, T.; Sadler, P. J., Speciation of precious metal anti-cancer complexes by NMR spectroscopy, *Drug Discovery Today: Technologies* (2015), 16, 7 – 15.
- [157] Novotný, J.; Sojka, M.; Komorovsky, S.; Nečas, M.; Marek, R., Interpreting the Paramagnetic NMR Spectra of Potential Ru(III) Metallodrugs: Synergy between Experiment and Relativistic DFT Calculations, *Journal of the American Chemical Society* (2016), 138, 8432 – 8445.
- [158] Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz, Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG), https://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/_1.html (25.05.2019), Zuletzt geprüft am 25.05.2019.

- [159] ICH, Safety Guidelines, <https://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>, Zuletzt geprüft am 25.05.2019.
- [160] Caldwell, G. W.; Ritchie, D. M.; Masucci, J. A.; Hageman, W.; Yan, Z., The new pre-preclinical paradigm: compound optimization in early and late phase drug discovery, *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2001), 1, 353 – 366.
- [161] EMA, Evaluation of anticancer medicinal products in man - European Medicines Agency, <https://www.ema.europa.eu/en/evaluation-anticancer-medicinal-products-man> (2018), Zuletzt geprüft am 25.05.2019.
- [162] van der Laan, J. W.; DeGeorge, J. J., Global approach in safety testing, ICH guidelines explained, Springer (2013).
- [163] Shoemaker, R. H., The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen, *Nature Reviews Cancer* (2006), 6, 813 – 823.
- [164] National Cancer Institute, Enhancing Drug Discovery and Development, <https://www.cancer.gov/research/areas/treatment/enhancing-drug-discovery> (2015), Zuletzt geprüft am 03.06.2019.
- [165] Šatkauskas, S.; Jakštys, B.; Ruzgys, P.; Jakutavičiūtė, M., Different Cell Viability Assays Following Electroporation In Vitro, in: Miklavčič, D., *Handbook of Electroporation*, 9, Springer Verlag (2018), 1411 – 1424.
- [166] Nowakowski, R. S.; Lewin, S. B.; Miller, M. W., Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population, *Journal of Neurocytology* (1989), 18, 311 – 318.
- [167] Zhu, H., Propidium Iodide Staining of Cells for FACS Analysis, *Bio-Protocol* (2012), 2.
- [168] Petersen, S. E., Accuracy and reliability of flow cytometric DNA analysis using a simple, one-step ethidium bromide staining protocol, *Cytometry* (1986), 7, 301 – 306.
- [169] Mickisch, G.; Fajta, S.; Keilhauer, G.; Schlick, E.; Tschada, R.; Alken, P., Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT), *Urological Research* (1990), 18, 131 – 136.
- [170] Sawicki, W.; Kieler, J.; Briand, P., Vital Staining with Neutral Red and Trypan Blue of 3 H-Thymidine-Labeled Cells Prior to Autoradiography, *Stain Technology* (1967), 42, 143 – 146.
- [171] Hussain, R. F.; Nouri, A. M. E.; Oliver, R. T. D., A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay, *Journal of Immunological Methods* (1993), 160, 89 – 96.
- [172] Paull, K. D.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R.; Parsons, J. L.; Risbood, P. A.; Barbera, W. A.; Sharma, M. N.; Baker, D. C.; Hand, E.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Alley, M. C.; Grote, M., The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan, *Journal of Heterocyclic Chemistry* (1988), 25, 911 – 914.

- [173] Filman, D. J.; Brawn, R. J.; Dandliker, W. B., Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage, *Journal of Immunological Methods* (1975), 6, 189 – 207.
- [174] Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols* (2008), 3, 1125 – 1131.
- [175] Scragg, M. A.; Ferreira, L. R., Evaluation of different staining procedures for the quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates, *Analytical Biochemistry* (1991), 198, 80 – 85.
- [176] Gillies, R. J.; Didier, N.; Denton, M., Determination of cell number in monolayer cultures, *Analytical Biochemistry* (1986), 159, 109 – 113.
- [177] van Tonder, A.; Joubert, A. M.; Cromarty, A. D., Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays, *BMC Research Notes* (2015), 8, 47.
- [178] Scheffler, H.; You, Y.; Ott, I., Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes, *Polyhedron* (2010), 29, 66 – 69.
- [179] Lei, K. F.; Hsieh, S.-C.; Goh, A.; Kuo, R.-L.; Tsang, N.-M., Proliferation arrest, selectivity, and chemosensitivity enhancement of cancer cells treated by a low-intensity alternating electric field, *Biomedical Microdevices* (2018), 20, 1 – 9.
- [180] Kratz, F.; Keppler, B. K.; Hartmann, M.; Messori, L.; Berger, M. R., Comparison of the Antiproliferative Activity of Two Antitumour Ruthenium(III) Complexes With Their Apotransferrin and Transferrin-Bound Forms in a Human Colon Cancer Cell Line, *Metal-based drugs* (1996), 3, 15 – 23.
- [181] Brunner, D.; Frank, J.; Appl, H.; Schöffl, H.; Pfaller, W.; Gstraunthaler, G., Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database, *ALTEX* (2010), 27, 53 – 62.
- [182] Matsui, T.; Ito, C.; Kato, A.; Wu, T.-S.; Itoigawa, M., Acrofolione A and B, acetophenone dimers from *Acronychia pendunculata*, induce an apoptotic effect on human NALM-6 pre-B cell leukaemia cells, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2019), 71, 348 – 361.
- [183] Yiallourous, M.; Creutzig, U., PDF-Datei der Kurzfassung der Patienteninformation zur akuten lymphblastischen Leukämie (ALL), *Pediatric Oncology and Hematology Publications* (2006).
- [184] Gelbe Liste Online, B-Zell akute lymphatische Leukämie | Gelbe Liste, <https://www.gelbe-liste.de/orphan-diseases/b-zell-akute-lymphatische-leukamie-b-all>, Zuletzt geprüft am 19.05.2019.
- [185] Dobroschke, M.; Geldmacher, Y.; Ott, I.; Harlos, M.; Kater, L.; Wagner, L.; Gust, R.; Sheldrick, W. S.; Prokop, A., Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction, *ChemMedChem* (2009), 4, 177 – 187.

- [186] Onko Internetportal, Therapie akuter Leukämien, <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/leukaemie/therapie/therapie-akuter-leukaemien.html> (2017), Zuletzt geprüft am 19.05.2019.
- [187] König, M.; Siegmund, D.; Raszeja, L. J.; Prokop, A.; Metzler-Nolte, N., Resistance-breaking profiling and gene expression analysis on an organometallic Rel-phenanthridine complex reveal parallel activation of two apoptotic pathways, *MedChemComm* (2018), 9, 173 – 180.
- [188] Onko Internetportal, Burkitt-Lymphom, <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/burkitt-lymphom.html> (2019), Zuletzt geprüft am 19.05.2019.
- [189] Herzenberg, L. A.; Sweet, R. G., Fluorescence-Activated Cell Sorting, *Scientific American* (1976), 234, 108 – 117.
- [190] Ibrahim, S. F.; van den Engh, G., Flow cytometry and cell sorting, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (2007), 106, 19 – 39.
- [191] Gottesman, M. M., Mechanisms of cancer drug resistance, *Annual Review of Medicine* (2002), 53, 615 – 627.
- [192] Nanayakkara, A. K.; Follit, C. A.; Chen, G.; Williams, N. S.; Vogel, P. D.; Wise, J. G., Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells, *Scientific Reports* (2018), 8, 967.
- [193] Dragoun, M.; Günther, T.; Frias, C.; Berkessel, A.; Prokop, A., Metal-free salan-type compound induces apoptosis and overcomes multidrug resistance in leukemic and lymphoma cells in vitro, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (2018), 144, 685 – 695.
- [194] Thermo Fisher Scientific, JC-1 Dye (Mitochondrial Membrane Potential Probe), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T3168>, Zuletzt geprüft am 28.05.2019.
- [195] Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1959), 82, 70 – 77.
- [196] Ott, I.; Qian, X.; Xu, Y.; Vlecken, D. H. W.; Marques, I. J.; Kubutat, D.; Will, J.; Sheldrick, W. S.; Jesse, P.; Prokop, A.; Bagowski, C. P., A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor, *Journal of Medicinal Chemistry* (2009), 52, 763 – 770.
- [197] Schmidt, C.; Albrecht, L.; Balasupramaniam, Shantheya; Misgeld, Rainer; Karge, Bianka; Brönstrup, Mark; Prokop, Aram; Baumann, Knut; Reichl, Stephan; Ott, Ingo, A gold(i) biscarbene complex with improved activity as a TrxR inhibitor and cytotoxic drug: comparative studies with different gold metallodrugs, *Metallomics* (2019), 11, 533 – 545.

- [198] Lopachin, R. M.; Gavin, T.; Decaprio, A.; Barber, D. S., Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant - target interactions, *Chemical research in toxicology* (2012), 25, 239 – 251.
- [199] Pearson, R. G., Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories, *Journal of Chemical Education* (1968), 45, 643.
- [200] Holmgren, A., Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin, *Methods in Enzymology* (1984), 107, 295 – 300.
- [201] Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Roth, H. J., *Medizinische Chemie, Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie*, Deutscher Apotheker-Verlag (2010), 2. Auflage.
- [202] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001), 46, 3 – 26.
- [203] Schmidt, C., Synthese und bioanalytische Charakterisierung von neuen halogenierten N-heterozyklischen Carben Gold(I) Organometallkomplexen als potentielle Zytostatika und Antibiotika (2017).
- [204] Analytik Jena, Manual_contrAA800_de, https://www.analytik-jena.us/fileadmin/content/products/contrAA/Manual_contrAA800_en.pdf (2017), Zuletzt geprüft am 20.08.2019.
- [205] Mattiazzi, P.; Bohrer, D.; Becker, E.; Viana, C.; Nascimento, P. C.; Carvalho, L. M., High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for screening elemental impurities in drugs to adhere to the new international guidelines, *Talanta* (2019), 197, 20 – 27.
- [206] Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Instrumentelle Analytik*, Springer Berlin Heidelberg (1996), 1. Auflage.
- [207] Welz, B.; Morés, S.; Carasek, E.; Vale, M. G. R.; Okruss, M.; Becker-Ross, H., High-Resolution Continuum Source Atomic and Molecular Absorption Spectrometry - A Review, *Applied Spectroscopy Reviews* (2010), 45, 327 – 354.
- [208] Resano, M.; Rello, L.; Flórez, M.; Belarra, M. A., On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (2011), 66, 321 – 328.
- [209] Welz, B.; Sperling, M., *Atomabsorptionsspektrometrie*, Wiley-VCH (1997), 4. Auflage.
- [210] Skiba, J.; Schmidt, C.; Lippmann, P.; Ensslen, P.; Wagenknecht, H.-A.; Czerwieniec, R.; Brandl, F.; Ott, I.; Bernaś, T.; Krawczyk, B.; Szczukocki, D.; Kowalski, K., Substitution of Metallocenes with [2.2]Paracyclophane to Enable Confocal Microscopy Imaging in Living Cells, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2017), 2017, 297 – 305.
- [211] Jochems, C. E. A.; van der Valk, J. B. F.; Stafleu, F. R.; Baumans, V., The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?, *Alternatives to Laboratory Animals* (2002), 30, 219 – 227.

- [212] Anderson, I., Fetal calf serum drought hits cell culture laboratories, *Nature* (1980), 285, 63.
- [213] Würtenberger, I.; Gust, R., A highly sensitive method for in vitro testing of fluorinated drug candidates using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014), 406, 3431 – 3442.
- [214] Heitmann, U.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Huang, M. D.; Okrus, M., Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (2006), 21, 1314.
- [215] Wellmütz, J.; Gluschke, M., Leitlinie zur Methodvalidierung, Umweltbundesamt (2005).
- [216] Kriegelstein, J., Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln, *Klinische Wochenschrift* (1969), 47, 1125 – 1130.
- [217] Ma, J.; Stoter, G.; Verweij, J.; Schellens, J. H., Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (1996), 38, 391 – 394.
- [218] ATCC, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC® 43300™, https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/43300.aspx?geo_country=de#characteristics (2016), Zuletzt geprüft am 07.06.2019.
- [219] Haamann, F.; Dulon, M.; Nienhaus, A., MRSA as an occupational disease: a case series, *International Archives of Occupational and Environmental Health* (2011), 84, 259 – 266.
- [220] Bundesministerium für Gesundheit, Krankenhauskeim MRSA, <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/infektionskrankheiten/mrsa.html> (2019), Zuletzt geprüft am 07.06.2019.
- [221] WHO, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (2017), Zuletzt geprüft am 09.07.2019.
- [222] Cetinkaya, B.; Ozdemir, I.; Binbaşıoğlu, B.; Durmaz, R.; Günel, S., Antibacterial and antifungal activities of complexes of ruthenium (II), *Arzneimittel-Forschung* (1999), 49, 538 – 540.
- [223] Devagi, G.; Dallemer, F.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R., Organometallic ruthenium(II) complexes containing NS donor Schiff bases: Synthesis, structure, electrochemistry, DNA/BSA binding, DNA cleavage, radical scavenging and antibacterial activities, *Journal of Organometallic Chemistry* (2018), 854, 1 – 14.
- [224] Martínez, A.; Carreon, T.; Iniguez, E.; Anzellotti, A.; Sánchez, A.; Tyan, M.; Sattler, Aaron; Herrera, L.; Maldonado, R. A.; Sánchez-Delgado, R. A., Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium-clotrimazole complexes display high in vitro activity against *Leishmania*

- major and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells, *Journal of Medicinal Chemistry* (2012), 55, 3867 – 3877.
- [225] Oehninger, L.; Rubbiani, R.; Ott, I., N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry, *Dalton Transactions* (2013), 42, 3269 – 3284.
- [226] Harbut, M. B.; Vilchèze, C.; Luo, X.; Hensler, M. E.; Guo, H.; Yang, B.; Chatterjee, A. K.; Nizet, V.; Jacobs, W. R.; Schultz, P. G.; Wang, F., Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2015), 112, 4453 – 4458.
- [227] Schmidt, C.; Karge, B.; Misgeld, R.; Prokop, A.; Franke, R.; Brönstrup, M.; Ott, I., Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects, *Chemistry, A European Journal* (2017), 23, 1869 – 1880.
- [228] Hintermann, L., Expedient syntheses of the N-heterocyclic carbene precursor imidazolium salts IPr.HCl, IMes.HCl and IXy.HCl, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* (2007), 3, 1 – 5.
- [229] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A., *Gaussian 98W*, Version 5.4 Rev A.9 (1998), Gaussian, Inc.
- [230] Fogh, J., *Human Tumor Cells in Vitro*, Springer US; Imprint; Springer (1975), 1. Auflage.
- [231] Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M., A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 2, *Journal of the National Cancer Institute* (1973), 51, 1409 – 1416.
- [232] Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q. V., Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization, *In vitro* (1978), 14, 911 – 915.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Mentor meiner Arbeit, Prof. Dr. Ingo Ott, für die interessante Aufgabenstellung, für die Freiheiten eigene Ideen einzubringen und umzusetzen zu können, sowie der konstruktiven Diskussionen, die ich während der Zeit der Promotion genießen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats und bei Herrn Prof. Dr. Stephan Scherneck (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, TU Braunschweig) für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission recht herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Prof. Dr. Julia Bandow und Pascal Prochnow (Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die Durchführung des Mikroboullion-Verdünnungstests. Dr. Dr. Aram Prokop und Nicola Wilke (Forschungsgruppe Experimentelle Onkologie, Kinderkrankenhaus Köln) danke ich für die Ergebnisse der Apoptose-Studien. Prof. Dr. Christian Hartinger und seiner Arbeitsgruppe (University of Auckland, Neuseeland) danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Prof. Dr. Peter Jones (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, TU Braunschweig) danke ich für die Durchführung der Kristallstrukturanalyse, Frau Dr. Ibrom und Frau Holba-Schulz (Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig) für die Aufnahmen der NMR-Spektren, sowie Herrn Dr. Papke (Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig) für die Aufnahmen der Massenspektren.

Bei Prof. Dr. Iztok Turel und meiner Austauschdoktorandin Jerneja Kladnik (FKKT, University of Ljubljana, Slowenien) möchte ich mich für das gelungene DAAD-Projekt bedanken, in dem Simon Preložnik als Masterstudent für sechs Monate in Deutschland mitgewirkt hat und ich die Möglichkeit hatte, drei Wochen in der Arbeitsgruppe in Ljubljana zu hospitieren. Dem DAAD sei für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes gedankt.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie bedanken: Daniela Eberle, Britta Thomas, Eduard Hinz, Matthias Söchtig, Petra Reich, Sandra Meyer, Kerstin Staats und ganz besonders Frank Roesse.

Meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis danke ich für die spaßigen Unterhaltungen, die nicht immer fachlicher Thematik waren und die zu einer tollen Arbeitsatmosphäre während meiner Promotion geführt haben. Petra Lippmann danke ich darüber hinaus für die tatkräftige Unterstützung gepaart mit guter Laune im Biolabor. Den Limonen Rolf Büssing und Dr. Claudia Schmidt sei an dieser Stelle ganz besonders für die fachlichen Diskussionen und das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Dr. Lutz Preu für die Hilfe bei der Auswertung und Interpretation von NMR-Spektren, der molekularen Modellierung einer meiner Substanzen, das ambitionierte Korrekturlesen dieser Arbeit und der Betreuung während meiner Weiterbildung zum Fachapotheker aussprechen. Darüber hinaus danke ich ihm und allen Kollegen des 8. Semester für die großartige Zusammenarbeit während der Betreuung und Organisation des Praktikums „Arzneistoffanalytik“ für Pharmaziestudierende und die damit zusammenhängenden unterhaltsamen Teerunden: Dr. Anne Meyer, Dr. Hoang Lande, Jessica Krause, Markus Immer, Holger Zagst.

Bei Lutz Löbermann und dem gesamten Team der Harz- und Werla-Apotheke in Schladen möchte ich mich für die großartige Arbeitszeit und Arbeitsatmosphäre außerhalb der Uni bedanken. Vor allem dafür, dass sie in stressigen Phasen Verständnis gezeigt haben, sodass ich auch mal in der Apotheke meine Arbeit weiterschreiben konnte.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung jeglicher Art danken: Danke Mama für die unendliche Rückendeckung deinerseits auf allen möglichen Ebenen. Danke Papa, dass du mit deinen Überredungskünsten nie lockergelassen hast und ich mich damals doch noch für ein Pharmaziestudium entschieden habe. Meinen Geschwistern Carl und Christine danke ich für das Computer-Knowhow, die Origin-Tipps und Formatierungshilfe, Institutsübergreifendes Networking nach Feierabend und vor allem die offenen Ohren, wenn bei der Arbeit mal nicht alles glatt lief.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Mädels danken, die immer an mich geglaubt haben, mir die Kraft und den Mut zum Weitermachen gegeben haben, aber auch immer wieder für die notwendige Ablenkung und Stressbewältigung gesorgt haben - sei es während des Feierabends, am Wochenende oder an exotischen Orten im Urlaub: Franzi Schubert, Anke Nemitz, Mara Lohmann, Claudia Schuder, Aga Varchmin und Claudia Schmidt. Ihr seid (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-6-(Hydroxymethyl)oxan-2,3,4,5-tetrol!